

# PHILIPS TECHNISCH TIJDSCHRIFT

JAARGANG 28, 1967, no. 3/4



In het economische bestel van de landen waarin het Philipsconcern zijn activiteit ontplooit, wordt dit concern beschouwd als een elektrotechnische onderneming. Dat een dochteronderneming hiervan, de N.V. Philips-Duphar, zich o.a. bezighoudt met de vervaardiging van farmaceutica, is vanouds een reden tot verwondering geweest — en vaak genoeg is de verklaring voor deze schijnbaar ongerijmde ontwikkeling herhaald: de lampenfabriek, onderzoek doende naar alle mogelijke toepassingen van de straling die haar produkten uitzenden, raakt geïnteresseerd in de produktie van vitamine D door bestraling van provitamine met UV en neemt, op grond van een uitvinding die een markante sprong vooruit betekent, die produktie op industriële schaal zelf ter hand. Dat was omstreeks 1936. Veelomvattende research op organisch-chemisch en biochemisch gebied en applicatie-onderzoekingen die de nieuwe activiteit gaan begeleiden, voeren naderhand tot de vervaardiging van andere groepen van stoffen, en in enkele tientallen jaren groeit de dochteronderneming uit, niet alleen tot een der grootste producenten van vitamines, maar ook tot een belangrijke producent van pesticiden, farmaceutische spécialités enz.

Dit nummer van Philips Technisch Tijdschrift is aan het werk van de N.V. Philips-Duphar gewijd. Overeenkomstig de drie sferen waarin zich dit werk afspeelt — de verzorging van mens, dier en plant — zijn de artikelen globaal in drie groepen verdeeld. Het eerste artikel brengt verslag uit van de ontwikkeling der retro-steroiden,

een nieuwe klasse stoffen met hormonale werking; het zal in dit verband voor velen verrassend zijn dat het oerprodukt van Duphar, het vitamine D, aanleiding heeft gegeven tot onderzoekingen over het antifertiliteitsprobleem. Een volgend artikel behandelt het kweken van virusvaccins, die in de geneeskunde voor mens en dier steeds belangrijker worden. De overgang naar de agrarische sector wordt gemarkeerd door het derde artikel, dat het gebruik van de vitaminen in veevoeder tot thema heeft. Er volgt een artikel dat een zeer algemeen probleem betreffende de beïnvloeding van de levende cel met chemische verbindingen belicht, nl. het probleem van de „beschikbaarheid”; deze speelt o.a. in de werking van pesticiden een essentiële rol. Als intermezzo worden

onderzoekingen besproken die in de biochemische groep van het Natuurkundig Laboratorium worden verricht over de formatieve invloed van licht op planten (fotomorfogenese); men interesseert zich vooral voor de reguleringsmechanismen die hierbij — evenals bij de plantenbescherming met chemische middelen — in het geding komen. Midden in de praktische problemen staan we ten slotte in het zesde artikel, dat het complexe probleem van de „formulering” der pesticiden bespreekt, d.i. het brengen van de chemische verbindingen, die in principe de gewenste werking hebben, in vormen die bruikbaar zijn in de praktijk, o.a. ook voor bespuiting vanuit vliegtuigen.

De afsluiting van deze reeks vormt een artikel dat allerlei leerzaams en vermakelijks uit de historie van de bestrijding van landbouwplagen put — en daarmee wellicht bijdraagt tot een zinvolle beoordeling van wat thans op dit gebied gaande is.

Enkele tussengestrooide afbeeldingen helpen lacunes in het beeld van deze industrie vullen: het gezicht van de chemische massafabricage, het raffinement van het hanteren van radioactieve isotopen — die eveneens tot het activiteitsgebied behoren<sup>[\*]</sup> — en de in vele landen opgezette en veel tijd vergende proeven aan gewassen.

[\*] Uitvoerig wordt deze zijde van het werk van Philips-Duphar behandeld in: A. H. W. Aten jr. en J. Halberstadt, De produktie van radio-isotopen, Philips techn. T. 15, 317-329, 1953. Zie ook Philips techn. T. 22, 255, 1960.

## Retro-steroiden

Een nieuwe klasse verbindingen met geslachtshormonale werking

O. A. de Bruin, H. F. L. Schöler en J. N. Walop

De onderlinge afhankelijkheid van de verschillende organen, weefsels of cellen van een organisme maakt een communicatiesysteem noodzakelijk, door middel waarvan de diverse onderdelen invloed op elkaar kunnen uitoefenen. Voor een snel reageren maakt het menselijk lichaam in het algemeen gebruik van het zenuwstelsel, voor een minder snelle maar langer aanhoudende werking, van het hormonale systeem. Beide systemen zijn zeer nauw gecoördineerd.

De hormonen, die hun werking uitoefenen via de bloedbanen, worden geproduceerd in endocrine klieren ofwel klieren met interne secretie. De productieplaatsen van de geslachtshormonen zijn de hypofyse, de ovaria van de vrouw en de testes van de man. De hypofyse is een kliertje gelegen aan de basis van de hersenen, dat in nauwe verbinding staat met het zenuwstelsel. Het produceert bij man en vrouw identieke hormonen, die een stimulerende werking hebben op de productiecentra in de geslachtsklieren en daarom „gonadotrope hormonen” worden genoemd (gonade = geslachtsklier, troop = gericht). De in de ovaria en de testes geproduceerde hormonen zijn wel verschillend; de belangrijkste zijn de oestrogenen en progesteron in de ovaria en testosteron in de testes. Behalve hun voor man en vrouw specifieke geslachtshormonale werking oefenen ze op hun beurt ook invloed uit op de productie van de gonadotrope hormonen. Zo ontstaat door terugkoppeling een regulering van de hormoonproductie.

De gonadotrope hormonen enerzijds en de in de geslachtsklieren geproduceerde hormonen anderzijds behoren tot twee verschillende klassen van chemische verbindingen, de eerste zijn polypeptiden (eiwitten), de tweede zijn steroiden.

Van deze beide groepen der geslachtshormonen krijgen de steroiden omstreeks 1930 in sterke mate de aandacht van de onderzoekers van vele wetenschappelijke en industriële laboratoria, niet omdat de steroidhormonen medisch van groter belang zijn dan de andere, maar omdat men in staat blijkt de steroidhormonen en „varianten” ervan synthetisch te bereiden, hetgeen vooralsnog voor de gonadotrope hormonen niet

tot de mogelijkheden behoort.

De steroiden vormen een in de natuur, zowel in plant als dier, rijk vertegenwoordigde klasse verbindingen, interessant ook door de grote verscheidenheid van fysiologische werkingen die ze vertonen bij een sterke structurele verwantschap.

Uit vingerhoedskruid bereidt men een preparaat (digitalis), dat door zijn werking op het menselijk hart al sinds 1785 in gebruik is als geneesmiddel bij hartafwijkingen. Cholesterol wordt aangetroffen in het bloed en verder in alle weefsels van het dierlijk organisme; het heeft een belangrijke rol bij de opbouw van celmembranen. Galzuren vervullen een functie bij de spijsvertering van vetten. Provitamine D vertoont na bestraling met UV-licht en omzetting tot vitamine D een antirachitische werking. Tot de steroiden behoort ten slotte ook de groep der bijnierschors-hormonen, die een zó essentiële functie vervullen in het lichaam dat wegnemen van de bijnier binnen enkele dagen de dood ten gevolge heeft.

Omstreeks 1930, de tijdsperiode waarin de chemische structuur van de geslachtshormonen komt vast te staan, beginnen intensieve onderzoeken met als doel de synthese uit de in de natuur voorkomende steroiden. Daarna volgen pogingen om door allerlei variaties in de structuur stoffen te bereiden met een sterkere of een betere (meer selectieve) werking dan de natuurlijke hormonen — waarin men wonderwel zou slagen. Een belangrijke nieuwe stimulans kreeg het steroidonderzoek toen in 1949 de werking van cortison, een bijnierschors-hormoon, tegen chronisch reuma bekend werd. De laatste grote impuls tot verdergaand onderzoek over steroiden was de ontdekking van de anticonceptionele werking van sommige steroiden: de uitvinding van „de pil”, omstreeks tien jaar geleden.

De interesse bij Philips-Duphar voor de steroiden is even oud als deze onderneming zelf: in dit tijdschrift is reeds in 1938 een artikel gepubliceerd waarin beschreven wordt hoe men bij Philips bij het zoeken van toepassingen voor UV-lampen in het vitamine-D-onderzoek terecht kwam <sup>[1]</sup>.

*Dr. O. A. de Bruin, drs. H. F. L. Schöler en dr. J. N. Walop, medewerkers van N.V. Philips-Duphar, Researchlaboratoria te Weesp.*

<sup>[1]</sup> A. van Wijk, Philips techn. T. 3, 33, 1938.

<sup>[2]</sup> Zie b.v. L. F. Fieser en M. Fieser, Steroids, Reinhold, New York 1959.

### Chemie der stereoïden

Chemisch omschrijven we de stereoïden als een klasse van organische verbindingen met een polycyclische structuur die uit vier met elkaar verweven koolstofringen bestaan: drie zesringen en een vijftring. Wij geven in fig. 1a dit koolstofskelet weer, met de gebruikelijke nummering der koolstofatomen en met de letters waarmee de ringen worden aangeduid; fig. 1b is een ruimtelijke weergave van het skelet.

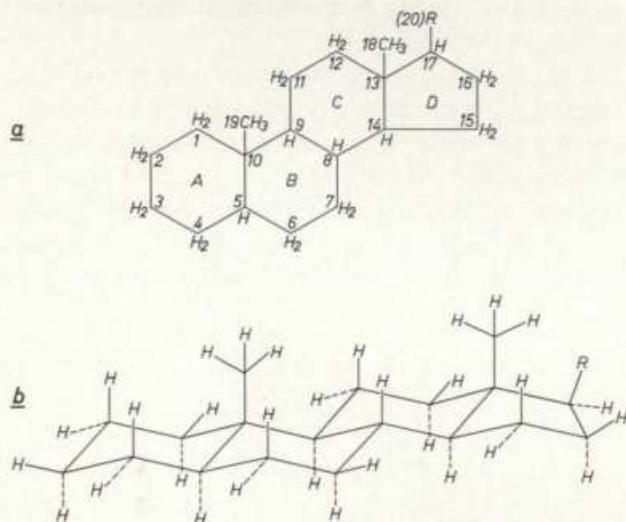
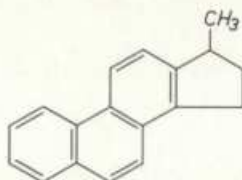


Fig. 1. Het stereoïdskelet, schematisch (a) en ruimtelijk (b) weergegeven. R is een zijketen. Een gestippelde lijn geeft aan dat de desbetreffende substituent zich onder het vlak bevindt dat men zich door de koolstofatomen van de ring kan denken, een getrokken lijn dat de substituent zich erboven bevindt.

Van enkele stereoïdverbindingen geven wij in fig. 2 de structuurformule, met name van de vrouwelijke geslachtshormonen oestradiol en progesteron, van het mannelijke geslachtshormoon testosteron, en van ergosterol (een aan cholesterol verwante verbinding), aangezien deze verbindingen in ons verdere verhaal een rol spelen.

De structuuropheldering is een tijdrovend en moeilijk werk geweest; wij verwijzen hiervoor naar de literatuur [2]. Vermeld zij hier slechts dat een behandeling met seleen bij de verschillende verbindingen leidde tot de vorming van een zelfde produkt, het methyl-cyclopentenofenantheen:



Hiermede was de samenhang van de genoemde verbindingen op duidelijke en elegante wijze bewezen.

De werking van seleen is dat het waterstof onttrekt aan de zesringen van het stereoïdskelet, waardoor deze in hun onverzadigde vorm worden gebracht. Deze zg.

aromatisering gaat gepaard met afbraak van stukken van het koolstofskelet, zoals de methylgroepen 18 en 19. Ook het levende organisme is in staat tot een aromatisering, zij het dat die meestal beperkt blijft tot ring A. Op deze, fysiologisch uiterst belangrijke, reactie in het organisme komen we later uitvoerig terug.

Het verzadigde stereoïdskelet bezit verscheidene *asymmetrische koolstofatomen*, dat zijn koolstofatomen die via hun vier valenties aan vier *verschillende* atomen of atoomgroepen zijn gebonden. Er zijn bij een asymmetrisch koolstofatoom twee ruimtelijke rangschikkingen mogelijk, die elkaars spiegelbeeld zijn.

Testosteron en progesteron hebben, zoals men in fig. 2 ziet, zes asymmetrische koolstofatomen, oestradiol heeft er een minder, en ergosterol heeft er zelfs acht. De aanwezigheid van  $n$  asymmetrische koolstofatomen betekent dat er  $2^n$  verbindingen mogelijk zijn met dezelfde chemische structuur maar met een verschillende ruimtelijke rangschikking (stereo-isomeren). We hebben gewezen op het feit dat stereoïdverbindingen bij een grote structurele verwantschap aanzienlijke verschillen in fysiologische eigenschappen vertonen. Hun fysiologische werking is uiterst gevoelig voor veranderingen in chemische structuur, en men mag verwachten dat dit ook geldt voor veranderingen in hun ruimtelijke structuur. Gebleken is echter dat de natuur zich zowel in het plantaardige als in het dierlijke organisme hoofdzakelijk van één stereochemische structuur bedient voor de zeer verschillende taken die de stereoïdverbindingen te vervullen hebben. Een dergelijke voorkeur voor één bepaalde ruimtelijke configuratie is in de natuur overigens meer regel dan uitzondering. Bekend is bij voorbeeld dat de aminozuren waaruit natuurlijke eiwitten zijn opgebouwd,

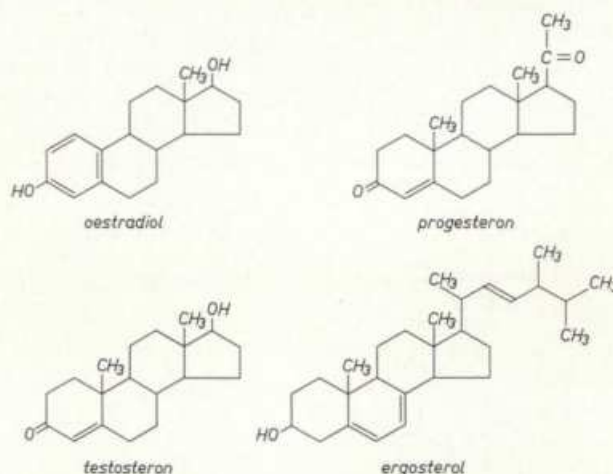


Fig. 2. De structuurformules van de vrouwelijke geslachtshormonen oestradiol en progesteron, van het mannelijke geslachtshormoon testosteron, en van ergosterol. Ergosterol levert bij bestraling met UV-licht vitamine D<sub>2</sub>. Een bijproduct van deze reactie is lumisterol<sub>2</sub>, de oorspronkelijke uitgangsstof voor de bij Philips-Duphar gesynthetiseerde retro-stereoïden, zie fig. 3, 4 en 5.



- 1) het 6-dehydro-retro-progesteron ofwel dydrogesteron, dat onder de naam „Duphaston” [\*] in de handel is gebracht;
- 2) de 16 $\alpha$ -ethylether van dydrogesteron;
- 3) het 17 $\alpha$ -(2'-methallyl)-retro-testosteron.

In fig. 5 is schematisch de bereiding van deze verbindingen aangegeven. Voor de tweede verbinding is een speciale weg gevolgd. Niet alle koolstofatomen van de steroïden zijn even gemakkelijk toegankelijk voor chemische substitutie, en sinds een tiental jaren maakt men in zulke gevallen wel gebruik van micro-organismen, die soms zeer specifiek een bepaalde hydroxylering uitvoeren. Een onderzoek in deze richting wees uit dat micro-organismen ook retro-steroïden omzetten [6]. Zo kon met vrucht gebruik gemaakt worden van de schimmel *Sepedonium ampullosporium* voor de omzetting van dydrogesteron in het 16 $\alpha$ -hydroxyderivaat ervan, dat verder langs de gebruikelijke chemische weg werd omgezet in de 16 $\alpha$ -ethyletherverbinding.

Als slot van dit hoofdstuk tonen we in fig. 6 de sterke verandering in de ruimtelijke bouw die het gevolg is van de omzetting in de retrovorm [7].

### De farmacologische werking

Bij het synthetische werk aan geslachtshormonen streeft men in het algemeen de volgende doeleinden na:

- a) Versterking of verzwakking van bepaalde werkingen van het natuurlijke hormoon — met het doel een meer specifiek werkend middel te verkrijgen.
- b) Het verkrijgen van orale werkzaamheid — de meeste

natuurlijke geslachtshormonen zijn bij orale toediening niet voldoende werkzaam.

Wij zullen laten zien welke resultaten wij op dit gebied met retro-steroïden hebben kunnen bereiken, met

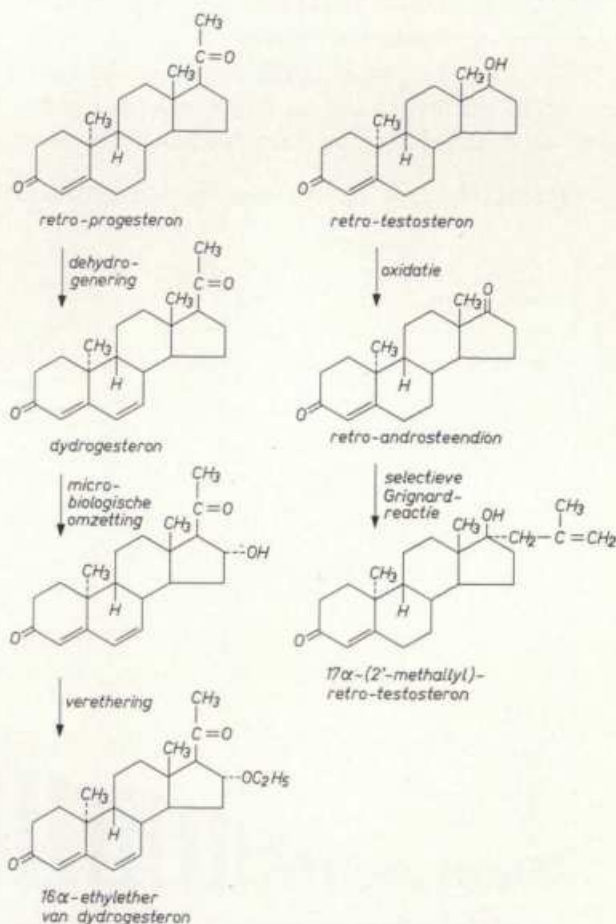


Fig. 5. Reactieschema voor de bereiding van dydrogesteron, de 16 $\alpha$ -ethylether van dydrogesteron en 17 $\alpha$ -(2'-methallyl)-retro-testosteron.

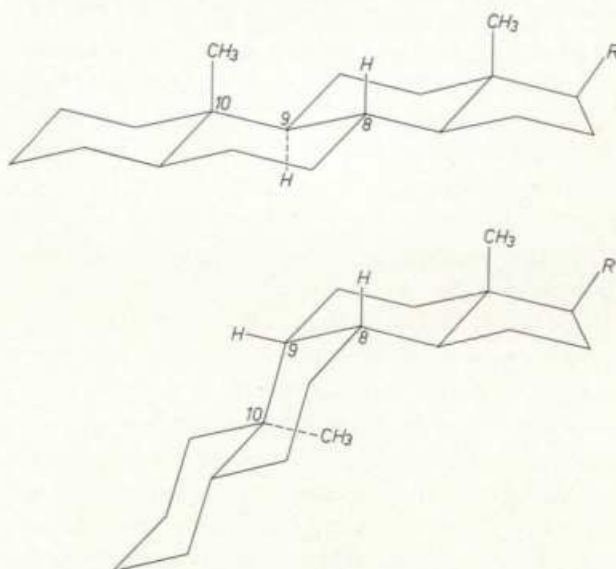


Fig. 6. De ruimtelijke bouw van het normale steroïdskelet (boven) en van het retro-steroïdskelet (onder).

[\*] Geregistreerd handelsmerk van N.V. Philips-Duphar.

[3] A. G. Boer, J. van Niekerk, E. H. Reerink en A. van Wijk, Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch. **39**, 622, 1936; U.S. octrooi 2 163 659 (1939) en 2 216 719 (1940); J. van der Vliet, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **67**, 246 en 266, 1948.

[4] E. H. Reerink en A. van Wijk, Biochem. J. **23**, 1294, 1929; A. L. Koevoet, A. Verloop en E. Havinga, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **74**, 788, 1955; E. Havinga, A. L. Koevoet en A. Verloop, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **74**, 1230, 1955; P. Westerhof en J. A. Keverling Buisman, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **75**, 1243, 1956; M. P. Rappoldt, P. Westerhof, K. H. Hanewald en J. A. Keverling Buisman, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **77**, 241, 1958; M. P. Rappoldt, J. A. Keverling Buisman en E. Havinga, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **77**, 327, 1958; M. P. Rappoldt en E. Havinga, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **79**, 369, 1960; M. P. Rappoldt, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **79**, 392 en 1012, 1960.

[5] P. Westerhof en E. H. Reerink, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **79**, 771, 794 en 1118, 1960; P. Westerhof en A. Smit, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **80**, 1048, 1961; A. Smit en P. Westerhof, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **82**, 1107, 1963; P. Westerhof, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **83**, 1070, 1964; R. van Moorselaar, S. J. Halkes en E. Havinga, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **84**, 841, 1965; P. Westerhof, J. Hartog en S. J. Halkes, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **84**, 864, 1965; S. J. Halkes en E. Havinga, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **84**, 890, 1965; H. van Kamp en S. J. Halkes, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **84**, 904, 1965; P. Westerhof en J. Hartog, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **84**, 918, 1965.

[6] In samenwerking met de Kon. Nederl. Gist en Spiritus Fabriek Delft. Zie W. F. van der Waard, D. van der Sijde en J. de Flines, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **85**, 701, 712 en 721, 1966.

[7] C. Romers, E. van Heykoop, B. Hesper en H. J. V. H. Geise, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **84**, 885, 1965.

de drie genoemde verbindingen als voorbeeld. Voor een goed begrip is een elementaire kennis nodig van de menstruele cyclus bij de vrouw en de veranderingen die optreden bij beginnende zwangerschap.

De na de puberteit bij de vrouw regelmatig optredende menstruele bloedingen ontstaan als gevolg van een afstoten van de binnenbekleding van de baarmoeder, het zg. endometrium, die de invloed heeft ondergaan van de in het ovarium geproduceerde oestrogenen

manifesteert in de menstruele bloeding. Hierna heeft weer een nieuwe rijping plaats van een De Graafse follikel en het proces begint opnieuw. Dit gehele proces duurt ongeveer 28 dagen.

De produktie van de oestrogenen en ook van progesteron tijdens de cyclus wordt gestimuleerd door de hormonen die in de hypofyse worden gemaakt, de gonadotrope hormonen. Erg vereenvoudigd kunnen we zeggen dat het gonadotrope hormoon FSH (follikel

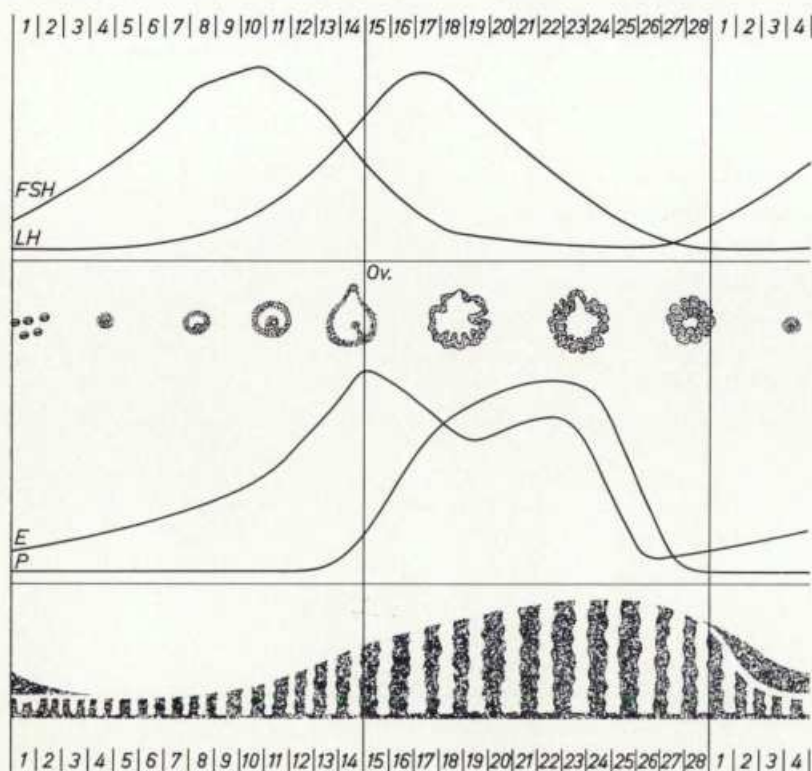


Fig. 7. De wisselwerking tussen de gonadotrope hormonen FSH en LH uit de hypofyse en de oestrogenen (E) en progesteron (P) uit het ovarium, en hun effecten op ovarium en endometrium in een normale menstruele cyclus.

en progesteron. De oestrogenen worden voornamelijk geproduceerd in de zg. De Graafse follikel, waarin een eicel tot rijping komt. Nadat het ei een voldoende graad van rijping heeft bereikt, springt de De Graafse follikel open (ovulatie) en groeien de cellen waarin het ei is ingebed geweest, uit tot een klier met interne secretie, het corpus luteum, die behalve oestrogenen ook nog progesteron produceert. Progesteron ontstaat dus pas in de tweede helft van de cyclus, terwijl de oestrogenen gedurende de gehele cyclus activiteit ontplooiën (fig. 7). Omdat het progesteron pas gevormd wordt en gaat werken nadat het eitje is afgestoten uit het ovarium, is het uit een teleologisch oogpunt begrijpelijk dat dit hormoon als belangrijkste taak heeft ervoor te zorgen dat het eitje, mocht het bevrucht worden, zich zal kunnen nestelen in de binnenbekleding van de baarmoeder, die daartoe door het progesteron geschikt gemaakt wordt (fig. 7 en fig. 8). Treedt er geen bevruchting op, dan degenereert het corpus luteum. De hormoonproduktie houdt op en als gevolg daarvan wordt het gehele endometrium afgestoten, wat zich

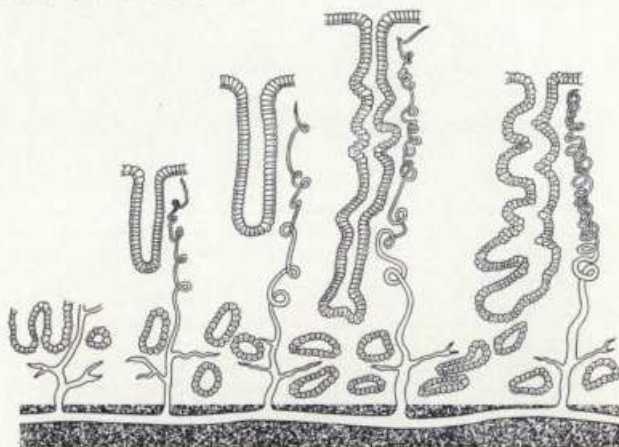


Fig. 8. Een nadere beschouwing van de veranderingen in het endometrium gedurende de menstruele cyclus. De eerste fase van opbouw, de zg. proliferatieve fase, staat onder invloed van de oestrogenen. Er vormen zich klieren, bloedvaten en ander weefsel. In de tweede fase, de secretiefase, krijgen bloedvaten en klieren onder invloed van progesteron een veel meer gekronkeld aanzien, bovendien beginnen de klieren substanties af te scheiden welke een bevruchte eicel kunnen voeden. Op het hoogtepunt van deze fase is het endometrium ongeveer 7 mm dik. In de premenstruele fase neemt de groei van het endometrium af door vermindering van bloedtoevoer, beëindiging van de kliersecreties en verlies aan water.

stimulerend hormoon) de produktie van de oestrogenen stimuleert, naast de groei van de De Graafse follikel, terwijl het induceren van de ovulatie en de produktie van progesteron wordt gestimuleerd door het gonadotrope hormoon LH (luteïniserend hormoon). Men zie het cyclusschema in fig. 7. Het cyclische karakter is gevolg van het feit dat de oestrogenen en progesteron op hun beurt de produktie van FSH en LH kunnen afremmen.

Treedt er wel bevruchting van het eitje op, dan gaat er een hormonale prikkel (HCG, zie het zwangerschapsschema in fig. 9) van het bevruchte en in de baarmoederwand genestelde ei naar het ovarium, waardoor het cor-

de vrijgekomen eitjes ook telkens weer bevrucht kunnen worden en deze zouden het oorspronkelijke bevruchte eitje kunnen schaden.

Een tweede werking van progesteron hangt met deze beschermende functie direct samen. Rond het ovulatie-tijdstip staat de baarmoedermond uitsluitend onder invloed van de oestrogenen. Deze zorgen ervoor dat de slijmcellen, die hier in grote hoeveelheid aanwezig zijn, een dun secreet afgeven, hetgeen de passage voor spermacellen zeer vergemakkelijkt, zodat bevruchting kan optreden. Het progesteron nu dat na deze ovulatie ontstaat en dat ook tijdens de zwangerschap in hoge concentratie aanwezig is, heeft op dit baarmoeder-

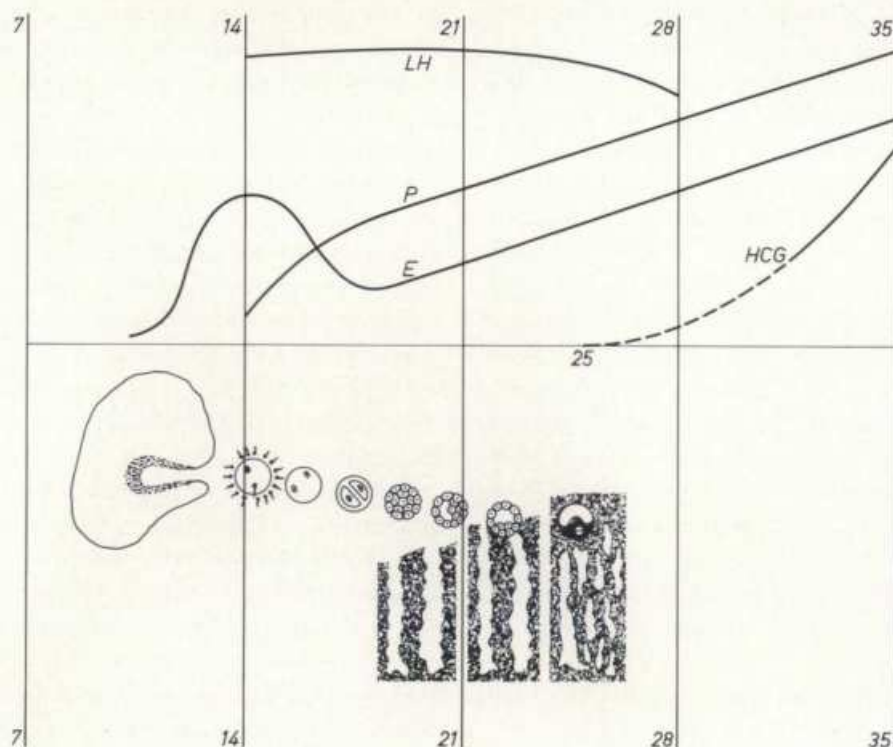


Fig. 9. Schematische voorstelling van de nesteling van de bevruchte eicel, en de hiermee verband houdende veranderingen in hormoonproduktie, vergeleken met die in een normale menstruele cyclus (vgl. fig. 7). Er vindt een voortgezette toeneming plaats van de produktie van de oestrogenen en progesteron, en vanaf ongeveer de 25ste dag van de cyclus begint de bevruchte eicel het hormoon HCG te produceren. Het gestippelde gedeelte van de curve HCG is door extrapolatie verkregen.

pus luteum niet degenerereert, met als gevolg dat de produktie van progesteron wordt voortgezet. Bovendien gaat het bevruchte ei zelf geleidelijk meer en meer progesteron maken. Het endometrium wordt bijgevolg gehandhaafd en er treedt gedurende de zwangerschap geen menstruatie op. De hypofyse wordt gedurende de zwangerschap geremd in zijn produktie van gonadotrope hormonen, waardoor geen hernieuwde eirijping meer kan plaatsvinden en dus ook geen ovulaties. Dit geheel kunnen we beschouwen als een bescherming voor het zich ontwikkelende embryo. Zouden er namelijk telkens nieuwe ovulaties optreden, dan zouden

mondslim (cervixslijm) een zeer sterk indikkende werking, waardoor passage van spermacellen zeer wordt bemoeilijkt of zelfs onmogelijk wordt. Hier komt weer de beschermende werking van progesteron ten aanzien van de zwangerschap op de voorgrond. Overigens zijn hiermede lang niet alle werkingen van progesteron genoemd.

#### Dydrogesteron („Duphaston”)

Er doen zich gevallen voor waarbij het lichaam niet of in onvoldoende mate progesteron produceert, met als gevolg b.v. bedreiging van het leven van de ingenestelde

vrucht, wat tot een miskraam kan leiden. Vereist de therapie dat men de patiënt een vervangingsmiddel van progesteron toedient, dan dient men er zeker van te zijn dat de stof die we daarvoor uitkiezen, alle genoemde werkingen van progesteron heeft. Het zich ontwikkelende embryo in de baarmoeder is uitermate gevoelig voor alle soorten hormonale werkingen en dus mag een vervangingsmiddel van progesteron geen hormonale nevenwerkingen bezitten. Het is niet voldoende dat een synthetisch produkt in de hiertoe opgezette proeven een progestatieve werking vertoont, er zal ook nagegaan moeten worden of deze stof op de vrucht geen schadelijke bijeffecten heeft. Aanvankelijk is men, op zoek naar oraal werkzame progestatieve verbindingen, vooral uitgegaan van mannelijke hormonale stoffen, die zekere werkingen met progesteron gemeen hebben. Bij het versterken van deze progestatieve werking, door verandering in de chemische structuur aan te brengen, verdween over het algemeen de mannelijke werking niet geheel. Het bezwaar bij gebruik van zulke stoffen tijdens de zwangerschap bleek dan ook — bij dierexperimenten <sup>[8]</sup> — vooral bij vrouwelijke embryo's. Voor de zwangerschapbehoudende werking bij de mens komt dit soort stoffen uiteraard niet in aanmerking.

In de tijd dat door ons gewerkt werd aan retro-progesteron, waren er slechts zeer weinig of geen oraal werkzame progestativa die niet één of meer hormonale bijeffecten hadden. Toen gebleken was dat retro-progesteron oraal toegediend een progestatieve werking had en 6-dehydro-retro-progesteron ofwel dydrogesteron zelfs in nog sterkere mate, zijn met deze verbindingen al de nodige proeven gedaan, waarbij alle soorten van progestatieve activiteit naast de mogelijke andere hormonale nevenwerkingen konden worden bepaald. Dydrogesteron bleek geen werkingen te bezitten die het natuurlijke progesteron niet heeft <sup>[9]</sup>.

Het heeft niet *alle* werkingen van het natuurlijke hormoon. Zo mist dit retro-steroïd het thermogene effect van het natuurlijke hormoon. Nemen we bij een volwassen en niet zwangere vrouw dagelijks (voordat ze 's morgens opstaat) de lichaamstemperatuur op, dan blijkt deze in de tweede helft van haar cyclus, dus na de ovulatie, 0,5 tot 1 °C hoger te liggen dan in de eerste helft van de cyclus. Ook tijdens de zwangerschap is de temperatuur enigszins verhoogd, vergeleken met de periode voorafgaand aan de ovulatie die tot bevruchting heeft geleid. Het is dus mogelijk om na toediening van dydrogesteron door temperatuurmeting na te gaan of de produktie van het eigen progesteron op gang komt. De afbraak van dit retro-steroïd in het lichaam verloopt anders dan die van het natuurlijke hormoon (zie het laatste hoofdstuk), zodat ook de uitscheidingsprodukten van het eigen progesteron naast die van het dydrogesteron kunnen worden

bepaald. Dit heeft voor de diagnostiek en de therapie zeer duidelijke voordelen. Men is nl. in staat na te gaan of tijdens de behandeling met dydrogesteron de eigen produktie, b.v. tijdens de zwangerschap (het genestelde ei gaat immers zelf ook progesteron maken), na een zekere periode hoog genoeg geworden is om de behandeling met het zwangerschapbehoudende middel te staken of aan te passen. We kunnen dus zeggen dat dydrogesteron een uitgesproken gunstige stof is om als vervangingsmiddel van progesteron te fungeren <sup>[10]</sup> wegens:

- a) zijn grote overeenkomst met het natuurlijke hormoon progesteron, aangetoond in een aantal progestatieve testen;
- b) zijn orale werkzaamheid;
- c) de totale afwezigheid van hormonale nevenwerkingen (het heeft met name geen vermannelijkende werking);
- d) het niet bemoeilijken van de diagnostiek.

Nog een andere eigenschap waarin dydrogesteron van progesteron verschilt, hebben we niet vermeld. Zoals gezegd treden er als gevolg van de werking van progesteron geen ovulaties op nadat zwangerschap is ingetreden. Het dydrogesteron mist deze ovulatiere-mende werking van progesteron. Zelfs in zeer hoge doses heeft de stof geen remmende invloed op het mechanisme dat in de normale cyclus de ovulatie tot stand brengt <sup>[10]</sup>.

Deze combinatie van eigenschappen maakt dat dydrogesteron in bepaalde gevallen niet alleen een zwangerschapbehoudende, maar ook een zwangerschapbevorderende werking vertoont. Bij onvruchtbaarheid ten gevolge van onvoldoende eigen progesteronproduktie bij voorbeeld kan toediening van dydrogesteron leiden tot een optimaal voorbereid endometrium zonder dat de kans op ovulatie verkleind wordt, hetgeen de kans op zwangerschap dus verhoogt.

#### *De 16 $\alpha$ -ethylether van dydrogesteron*

We zullen nu een tweede stof bespreken met een progestatieve werking, die in nog veel sterkere mate gespecialiseerd is in zijn activiteit, nl. de 16 $\alpha$ -ethylether van dydrogesteron. Deze stof vertoont een slechts zeer zwakke progestatieve werking op het endometrium en is evenals dydrogesteron niet ovulatiere-mmend. Als enig kenmerk van progestatieve werking treedt na toediening van deze stof een sterke indikking op van het cervixslijm. Dit ingedikte cervixslijm kan zoals reeds eerder besproken een barrière zijn voor spermacellen.

Bij toediening van deze stof in de eerste helft van de cyclus, dus voor de ovulatie, wordt het cervixslijm, dat in deze periode normaliter alleen onder invloed van oestrogenen staat en dun vloeibaar is, sterk ingedikt.

Waar het cervixslijm in die periode de bevruchting door een snelle ongeremde passage van spermacellen zou moeten bevorderen, wordt door toediening van deze stof (evenals bij andere progestatief werkende stoffen) de passage bemoeilijkt. Deze stof zou dus mogelijk een zwangerschapbelemmerende werking hebben, zonder daarbij andere progestatieve effecten teweeg te brengen. We komen hier bij de interessante vraag of op deze werking een anticonceptioneel preparaat te baseren zou zijn.

Vermoedelijk is de belangrijkste werking waarop de verschillende soorten anticonceptionele preparaten berusten, die welke een remming veroorzaakt van de gonadotrope stoffen uit de hypofyse. Dit werkingsmechanisme berust op een imitatie van het gebeuren tijdens de zwangerschap waarbij de ovulaties worden voorkomen. Toch zijn er een aantal aanwijzingen dat bij een aantal gebruiksters van anticonceptionele preparaten nog wel ovulaties optreden, zonder dat die gevolgd worden door een zwangerschap. Waarschijnlijk wordt dit uitblijven van zwangerschap veroorzaakt door andere (lokale) effecten van het anticonceptionele preparaat, nl. op de eileiders, de baarmoeder en het cervixslijm, die de bevruchtungskans verkleinen of het innestelingsproces belemmeren.

Zeer waarschijnlijk speelt bij de verschillende soorten van werking de verhouding van de oestrogenen en progestativa in de verschillende preparaten een grote rol, doch het zou ons te ver voeren hierop in te gaan.

Het zoeken naar stoffen met een contraceptieve werking vindt nog steeds voortgang, waarbij vooral juist op deze lokale effecten gelet wordt. De gevonden werking van de 16 $\alpha$ -ethylether van dydrogesteron is in dit verband zeer belangwekkend.

#### 17 $\alpha$ -(2'-methallyl)-retro-testosteron

Niet iedere cyclus gaat gepaard met een ovulatie. In dat geval wordt het endometrium dus niet door progesteron veranderd. In enkele gevallen treden er dan onregelmatigheden op in het menstruatiebeeld en kunnen er vrij langdurige bloedingen ontstaan.

We hebben er tot dusver nog niet over gesproken dat de werking van progesteron over het algemeen vooraf moet worden gegaan door de werking van de oestrogenen. In enkele gevallen kunnen hoge doses progesteron zelf een effect teweegbrengen, doch toevoeging van een kleine hoeveelheid oestrogeen versterkt de werking van progesteron aanzienlijk (synergistische werking).

Is er nu nog voldoende door de oestrogenen voorbewerkt endometrium aanwezig, dan is een progestatieve stof meestal in staat een bloeding als boven vermeld tot stilstand te brengen, doordat in het endometrium alsnog progestatieve veranderingen ontstaan. We

imiteren daardoor dus weer het beeld dat na een ovulatoire cyclus ontstaat. Staken we dan de toediening van het progestativum, dan zal meestal een normale menstruatie volgen.

In gevallen van zeer hardnekkige bloedingen waarbij progestativa niet helpen, kunnen we met een anti-oestrogene stof de bloeding wel tot stilstand brengen.

Een dergelijke stof is het 17 $\alpha$ -(2'-methallyl)-retro-testosteron. In die proeven die speciaal voor oestrogene werking zijn opgezet, is deze retroverbinding gebleken actief te zijn als antagonist van oestrogenen. De stof bleek een antagonistische werking te hebben zowel op de eigen oestrogenen als op die welke kunstmatig werden ingebracht (b.v. per injectie). Een lang aanhouden-de bloeding, ontstaan na een niet-ovulatoire cyclus, wordt door deze stof binnen 48 uur tot stilstand gebracht.

Een noodzakelijke voorwaarde om te kunnen komen tot een veilige toepassing van een retro-steroid als farmaceuticum is dat men nauwkeurig de veranderingen leert kennen welke het retro-steroid in het lichaam kan ondergaan. Dit vormt het onderwerp van het nu volgende hoofdstuk.

#### De omzettingen van de retro-steroiden in het lichaam

Bij het hele samenspel van hormonale regulatie, zoals deze in het lichaam plaatsvindt, is het uiteraard belangrijk dat de steroidhormonen na vervulling van hun functie worden geïnactiveerd en uit het lichaam worden uitgescheiden. Deze inactivering gebeurt voornamelijk in de lever; het lichaam heeft hier een reeks van enzymsystemen voor beschikbaar die de steroidmoleculen aangrijpen.

De eerste inactiveringsreacties bestaan uit reducties van de 3-keto-groep en de dubbele binding tussen C4 en C5 (zie fig. 10). Allereerst wordt de dubbele binding tussen C4 en C5 gereduceerd, waarbij op C5 een nieuw asymmetriecentrum ontstaat. Er bestaan speciale enzymen die hetzij de 5 $\alpha$ -, hetzij de 5 $\beta$ -verbindingen vormen (5 $\alpha$ - en 5 $\beta$ -reductases). Hierna vindt reductie van de 3-keto-groep plaats. Dit is de gebruikelijke wijze waarop verzadigde 3 $\alpha$ -hydroxy-steroiden in het lichaam ontstaan. Behalve deze eerste reacties treden nog verdere omzettingen op. Indien er een ketogroep op C20 aanwezig is, wordt deze gereduceerd; bij een aantal 17-OH-verbindingen wordt de gehele zijketen afgesplitst, en soms worden op diverse plaatsen nog hydroxylgroepen ingevoerd. De verzadigde verbindingen worden gekoppeld aan glucuronzuur of zwavelzuur,

[8] H. F. L. Schöler en A. N. de Wachter, *Acta endocrinol.* **38**, 128, 1961.

[9] H. F. L. Schöler, *Acta endocrinol.* **35**, 188, 1960.

[10] P. M. F. Bishop, U. Borell, E. Diczfalusy en K. G. Tillinger, *Acta endocrinol.* **40**, 203, 1962.

waardoor de hele verbinding een zodanig polair karakter krijgt dat de uitscheiding via de urine vlot plaatsvindt.

In overeenstemming met het bovenstaande blijkt in de urine van zwangeren als voornaamste metaboliet van progesteron voor te komen het pregnaan-3 $\alpha$ , 20 $\alpha$ -diol-glucuronide (fig. 10).

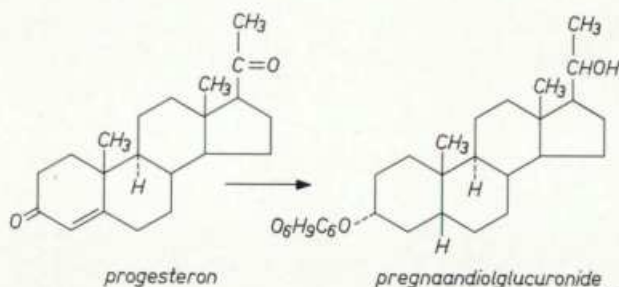


Fig. 10. De omzetting van progesteron tot een produkt dat via de urine wordt uitgescheiden.

Het was nu interessant om na te gaan hoe de retro-steroïden zich zouden gedragen ten opzichte van de enzymen die de natuurlijke steroïden aantasten.

Er werd begonnen met het gedrag te onderzoeken van de 5 $\alpha$ - en 5 $\beta$ -reductases uit rattelever. Zij komen op verschillende plaatsen in de cellen voor en zijn gescheiden te verkrijgen. De natuurlijk voorkomende steroïden worden door deze enzymen vlot gereduceerd. Synthetische derivaten van deze natuurlijke steroïden kunnen wel eens wat moeilijker worden aangetast; zo blijkt b.v. een dubbele binding tussen C6 en C7 de reductie aanzienlijk langzamer te doen verlopen. Het gedrag nu van de genoemde enzymen ten opzichte van retro-steroïden van zeer uiteenlopende aard valt eenvoudig samen te vatten: géén van de retro-steroïden wordt gereduceerd<sup>[11]</sup>. Dit geldt dus met name ook voor de genoemde stoffen dydrogesteron, de 16 $\alpha$ -ethylether van dydrogesteron en 17 $\alpha$ -(2'-methallyl)-retro-testosteron. De belangrijkste eerste aanval waaraan de normale steroïden in het lichaam blootstaan, kan blijkbaar bij de retro-steroïden niet plaatsvinden.

Zoals boven vermeld is, wordt bij progesteron ook de 20-keto-groep gereduceerd. Het desbetreffende enzym, de zg. 20-keto-reductase, werd nu ook onderzocht in zijn gedrag ten aanzien van retro-progesteron en dydrogesteron. In tegenstelling tot wat gevonden werd bij de 5-reductases, bleek de 20-keto-reductase de genoemde retro-steroïden wel te reduceren. Met het enzym uit de rat bleek de reductie met dezelfde snelheid te verlopen als bij progesteron het geval was; met een enzympreparaat van menselijke oorsprong ging de reductie van de retroverbindingen wel langzamer dan van progesteron.

Het enzym dat de 20-keto-groep reduceert, tast een groep aan die zich bevindt aan de zijketen van ring D

van het steroïdmolecuul, een plaats die nogal ver verwijderd is van die plaatsen die aan de retroconfiguratie haar eigen karakter geven. Wellicht komt het hierdoor dat de 20-keto-reductase de retro-steroïden wel aangrijpt, terwijl zoals we zagen de 5-reductases de retro-verbindingen onaangetast laten.

Bovenstaande resultaten, die verkregen zijn met geïsoleerde enzymen *in vitro*, zijn geheel in overeenstemming met wat tot dusverre bekend is over de afbraak van retro-steroïden door het lichaam. Wanneer radioactief gemerkt dydrogesteron door vrouwen wordt ingenomen, dan blijkt als voornaamste metaboliet in de urine te verschijnen het glucuronide van de op de 20-plaats gereduceerde verbinding<sup>[12]</sup> (fig. 11). In tegenstelling tot wat bij progesteron gebeurt, zien we hier dus geen reductie van de A-ring, maar slechts reductie van de ketogroep op C20. Er is dus een groot verschil met het metabolisme van progesteron.

De reacties die het dydrogesteron ondergaat, zijn dus beperkter dan bij b.v. progesteron het geval is, maar deze reacties gaan wel zo snel dat bij oraal gebruik van dydrogesteron door vrouwen binnen 8 uur al circa 40% van de ingenomen dosis via de urine is uitgescheiden.

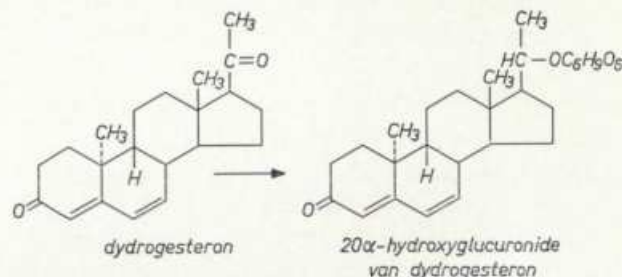


Fig. 11. De omzetting van dydrogesteron tot een uitscheidingsprodukt.

Behalve met de besproken reacties die tot inactivering en snelle uitscheiding leiden, hebben we in het lichaam uiteraard ook te maken met de vele reacties waardoor de hormonen worden gesynthetiseerd en waardoor het ene hormoon in het andere kan worden omgezet. Beschouwen we bij voorbeeld de oestrogene steroïden, die gekenmerkt zijn door een aromatische A-ring. Levende weefsels vormen deze stoffen door aromatiseringsreacties uit testosteron of androsteendion, b.v. volgens het schema in fig. 12.

Ook *in vitro* kan men deze oestrogenen vormen, door gebruik te maken van bepaalde enzymsystemen die voorkomen in de zg. microsomenfracties van de cellen

[11] J. N. Walop en N. de Lange, *ter perse*.

[12] E. Diczfalussy, K. G. Tillinger, R. J. E. Esser en A. C. Houtman, *Nature* **200**, 79, 1963.

[13] J. N. Walop en N. de Lange, *Biochim. Biophys. Acta* **130**, 249, 1966.

[14] M. Marois, *Bull. Acad. Nat. Médecine* **146**, 354, 1962.

van diverse organen, en deze enzymen in te laten werken op b.v. testosteron. Een enzymstelsel uit mense-lijke placenta dat deze eigenschap bezit, werd ook weer onderzocht op het vermogen om steroïden met de

retrostructuur te aromatiseren. Ook hier bleek dat de desbetreffende retro-steroïden door het onderhavige enzymstelsel niet worden aangegrepen [13]. Een aromatisering van b.v. retro-testosteron was niet aantoonbaar, terwijl anderzijds deze steroïden na blootstelling aan het enzym ook geen spoor van oestrogene werking in dierproeven vertoonden. Deze proeven vormen een aanwijzing dat bij gebruik van deze steroïden door de mens er geen oestrogene bijwerkingen door aromatisering op zullen treden. Dit gebrek aan oestrogene bijwerkingen is ook weer in overeenstemming met wat bekend is over de biologische eigenschappen van dydrogesteron [14].

De afwijkende configuratie die de retro-steroïden bezitten, kan uiteraard tot gevolg hebben dat de moleculen minder goed „passen” op de receptorplaatsen van die organen via welke zij hun werking moeten uitoefenen. Zijn echter eenmaal moleculen verkregen die voldoende goed passen om de biologische werking te bezitten — en het dydrogesteron is hier een voorbeeld van —, dan is dus het voordeel behaald dat de verbinding minder gemakkelijk door het lichaam in verwante steroïden wordt omgezet. Zoals we gezien hebben, treden bij dydrogesteron de reacties die aanleiding geven tot uitscheidingsproducten, voldoende snel op, maar zijn deze reacties aanzienlijk beperkter dan bij de natuurlijke steroïden en hun derivaten. Voor nevenwerkingen door overvoeren in andere hormonaal actieve steroïden behoeft men derhalve weinig vrees te hebben, zodat in de meeste gevallen een werking uitsluitend als voor de therapie vereist, is gewaarborgd.

**Samenvatting.** De door ovaria en testes geproduceerde geslachts-hormonen: de oestrogenen, progesteron en testosteron, behoren tot de steroïden. Retro-steroïden zijn steroïden met een  $9\beta,10\alpha$ -configuratie, welke men kan verkrijgen door bestraling van provitamine D. Van de aldus van de normale steroïdhormonen in ruimtelijke structuur afwijkende verbindingen zijn een drietal nader beschouwd wat betreft hun farmacologische eigenschappen en hun metabolisme. Dydrogesteron („Duphaston”) kan als oraal werkzaam vervangingsmiddel fungeren voor progesteron, b.v. bij dreigende miskraam. Het heeft behalve een zwangerschap-behoudende ook een zwangerschapbevorderende werking. De  $16\alpha$ -ethylether van dydrogesteron kenmerkt zich door een specifieke werking op het slijm van de baarmoedermond, en de verbinding  $17\alpha$ -(2'-methallyl)-retro-testosteron door een anti-oestrogene werking, hetgeen wellicht de reden is dat de stof in staat is bepaalde hardnekkige menstruele bloedingen te stoppen. De omzettingen van de retro-steroïden in het lichaam verlopen anders dan bij de natuurlijke steroïden. Er vindt b.v. geen aromatisering van de A-ring plaats, waardoor minder vrees behoeft te bestaan voor omzetting in andere hormonaal actieve steroïden, die oorzaak zouden kunnen zijn van nevenwerkingen.

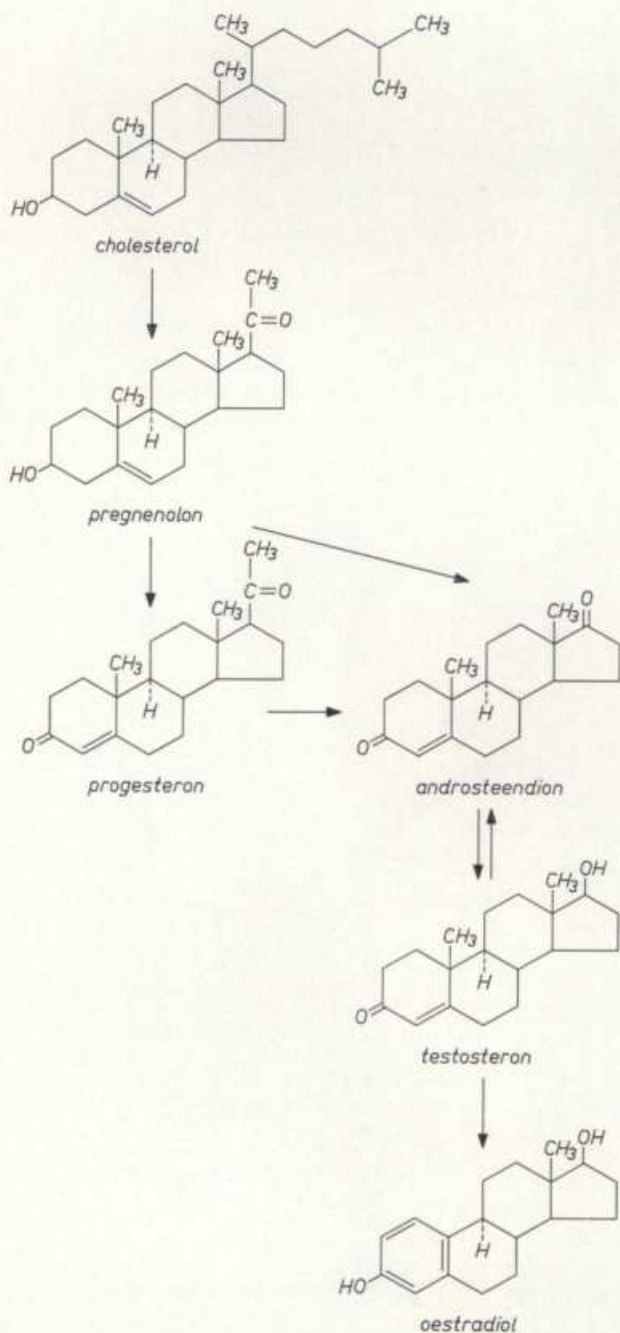


Fig. 12. Vereenvoudigd schema van de synthese in het lichaam van het vrouwelijk geslachtshormoon oestradiol.

## In het Cyclotron- en Isotopen-Laboratorium



Niet lang geleden heeft de N.V. Philips-Duphar een Cyclotron- en Isotopen-Laboratorium in gebruik genomen, gelegen op het terrein van het Reactor Centrum Nederland te Petten. De chemische bewerking van het in het laboratorium geproduceerde radioactieve materiaal vindt plaats in werkkasten, de zg. hot cells. De hier afgebeelde gang geeft toegang tot de achterzijde van deze werkkasten voor het verrichten van onderhoudswerkzaamheden. Voor dit doel kan de loden afscherming van de werkkasten opzij geschoven of verwijderd worden. Dit mag uiteraard eerst geschieden nadat de desbetreffende werkkast zo volledig mogelijk

is vrijgemaakt van radioactief materiaal. Toegang tot de gang wordt uitsluitend verleend aan speciaal hiervoor opgeleid en toegerust personeel, dat onder controle staat van de gezondheidsdienst van het laboratorium. De man rechts is met een zuurstofmasker aan het werk; de man links draagt een drukpak, dat via de slang op de grond van lucht wordt voorzien.

De druk in de gang wordt lager gehouden dan die in de werkkasten, om verspreiding van radioactiviteit via stofdeeltjes e.d. naar de werkruimte aan de voorzijde tegen te gaan. De pijpleidingen boven dienen voor ventilatie van de werkkasten.

# Bereiding van virusvaccins met behulp van weefselcultures

O. Bosgra en J. H. G. Roerink

Het lichaam van mens en dier kan tot op zekere hoogte aan binnendringende ziekteverwekkers — bacteriën of virussen — weerstand bieden. Afhankelijk van de virulentie en het aantal van deze ziekteverwekkers zal echter een groter of kleiner percentage van de geïnfecteerde individuen ziek worden en eventueel sterven. Bij de individuen die de ziekte overleven, zijn onder invloed van de ziekteverwekkers antistoffen in het bloedserum ontstaan. Deze beschermen (immuniseren) de individuen gedurende lange of korte tijd, soms zelfs levenslang. Deze onvatbaarheid is specifiek: er wordt alleen bescherming verkregen tegen een nieuwe infectie van dezelfde ziekteverwekker.

Met vaccineren beoogt men het individu een voor-sprong te geven, door het lichaam vóór de infectie reeds te stimuleren tot de vorming van antistoffen — waarbij uiteraard slechts een geringe nadelige invloed, in verhouding tot de ernst van de desbetreffende ziekte, op het welzijn mag worden uitgeoefend.

Het vaccineren kan gebeuren met geïnactiveerde of met levende „ziekte”-verwekkers; in het laatste geval maakt men gebruik van ongevaarlijke (zg. avirulente) stammen van de ziekteverwekker.

De methode van vaccineren danken wij voor een belangrijk deel aan de ontdekking van de Engelse chirurg Jenner in 1796. Jenner wist een immunisering tegen pokken bij de mens te verkrijgen door deze te infecteren met de voor de mens ongevaarlijke koe-pokverwekker. De naam vaccin (het Latijnse woord voor koe is vacca) herinnert thans nog aan deze ontdekking.

Vaccinatie is een profylactische maatregel, waarmee men uitsluitend beoogt een ziekte te voorkomen. Andere mogelijkheden biedt het antiserum, dat eveneens op de werking van antistoffen gebaseerd is. Een antiserum wordt bereid uit bloed van dieren die genezen zijn van een bepaalde infectie of die herhaaldelijk gevaccineerd zijn. In het antiserum zijn dus, in tegenstelling tot het vaccin, de nodige antistoffen reeds, in hoge concentratie, voorhanden, en het kan zijn werking onmiddellijk uitoefenen. Een medicus kan het antiserum preventief toepassen, om een kortdurende onvatbaarheid op te wekken, of curatief nadat de ziekte zich heeft gemanifesteerd. De uitsluitend profylactisch werkende vaccins verlenen echter, mits

tijdig toegepast, langere tijd bescherming tegen infectie dan met antisera het geval is.

Men kan zich afvragen wat de waarde is van de vaccinatie in het licht van de spectaculaire successen die behaald zijn met de moderne chemotherapeutica (sulfonamiden bij voorbeeld), met de antibiotica, en ook wel met antisera. Men dient dan te bedenken dat de ziekten die door toepassing van therapeutica hun greep op mens en dier voor een groot deel verloren hebben, bijna alle *bacteriële* infectieziekten zijn, geen virusziekten. Voor de laatste is vaccinatie van het grootste belang.

Een virus is een celparasiet. Een virus dat een cel binnendringt, dwingt de cel zijn stofwisseling in dienst te stellen van de vermeerdering van dit virus, en hieraan gaat de cel ten slotte te gronde. De ziektesymptomen die men na een virusinfectie waarneemt, zijn terug te voeren, *niet* op de grote hoeveelheid virus die wordt geproduceerd, maar op het als gevolg hiervan te gronde gaan van belangrijke celgroepen, en het ten gevolge hiervan ontstaan van stoornissen in de functie van bepaalde organen. Maar dat betekent dat we een virusziekte pas waarnemen — en gaan bestrijden! — als het grootste kwaad al geschied is. De chemotherapeutica, de antibiotica en de antisera, die zo succesvol zijn gebleken bij de bestrijding van bacteriële infectieziekten, komen voor de bestrijding van virusziekten als het ware een faze te laat.

Virussen zijn bovendien als regel ongevoelig voor antibiotica, en zij zijn in vele gevallen, doordat zij zich in de cellen vermenigvuldigen en niet buiten de cellen, zoals bij bacteriën veel meer het geval is, minder goed bereikbaar voor de genoemde therapeutica. Neemt men dit in aanmerking, dan begrijpt men de grote waarde van vaccins ter voorkoming van virusziekten.

## Het kweken van virussen op weefselcultures

Voor de bereiding van virusvaccins, zowel voor geïnactiveerde vaccins als voor levende avirulente vaccins, moet men virussen kweken op levend materiaal. Een heel geschikt medium heeft men hiervoor gevonden in bebroede kippeieren<sup>[1]</sup>. Een belangrijk deel van de huidige vaccins wordt met behulp van kippeieren gemaakt.

Dr. O. Bosgra en dr. J. H. G. Roerink, medewerkers van N.V. Philips-Duphar, Researchlaboratoria te Weesp.

[1] Zie b.v. A. J. Klein en E. Hertzberger, Philips techn. T. 12, 277, 1950.

Sterk in opkomst is thans echter de methode om virussen te kweken op weefselcultures. Dit kunnen weefsels zijn van elk willekeurig orgaan van zoogdieren of van vogels, maar ook van koudbloedige dieren, en zelfs van insecten. Het kunnen weefsels zijn van nieren, van testikels, van spieren, enz.

Er is een belangrijke reden om op weefselcultures over te gaan, en dat is de veel grotere verscheidenheid van virussen die op deze wijze gekweekt kunnen worden. We noemen b.v. het poliovirus, dat niet op kippe-eieren gekweekt kan worden, maar wel op weefselcultures van apenier, aan welke mogelijkheid we het poliovaccin te danken hebben. Andere belangrijke vaccins die men thans geheel op basis van weefselkweek fabriceert, zijn die tegen mazelen, tegen monden klauwzeer, tegen hondeziekte, tegen infectieuze honde-hepatitis en tegen runderpest en infectieuze rhinotracheitis bij runderen.

De celcultures waarop men de virussen wil kweken, dienen gevoed te worden. Het voedingsmedium moet voldoen aan zeer hoge eisen, in het bijzonder wat betreft de pH, de samenstellende zouten, het gehalte aan aminozuren, enz. Veel gebruikte voedingsmedia zijn de zg. oplossing van Eagle en het medium van Morgan [2].

Bij een geschikte keuze van de bestanddelen van het voedingsmedium kan men de cellen gedurende lange tijd in leven houden, waarbij het metabolisme van de cellen op normale wijze voortgang blijft vinden.

De meest toegepaste methode van weefselkweek bestaat uit de vorming van *primaire celcultures*. Een bepaald orgaan, b.v. een nier, bij voorkeur jong en nog groeiend, wordt in stukjes gesneden en behandeld met een eiwitplitsend enzym, b.v. trypsine. Door deze behandeling wordt de structuur van het weefsel aangetaast, en er komen cellen vrij die, hoewel ze uit hun structuur zijn losgemaakt, in leven blijven. Deze cellen worden overgebracht in flessen, buizen of ander vaatwerk dat een voedingsmedium bevat. De condities worden zodanig gekozen dat groei en vermenigvuldiging van de cellen plaatsvindt, en er zal zich al gauw een compacte, één cel dikke, zg. monolaag op de bodem van het glas vormen (fig. 1). Dit is dan de *primaire celcultuur*. Door een nieuwe behandeling met trypsine en overbrenging van de losgemaakte cellen naar een vers voedingsmedium verkrijgt men een *secundaire kweek*, hetgeen men vele malen kan herhalen. Indien het van belang is een grote uniformiteit aan cellen te verkrijgen, is de vorming van een dergelijke *continue cel-lijn* de aangewezen methode. Een aantal van zulke cel-lijnen zijn in de literatuur beschreven, de bekendste is wel de Hela-cel-lijn, die, gekweekt uit een kankergezwell van een menselijke baarmoederhals, thans reeds meer dan 10 jaar in stand is gehouden [3].

### Weefselkweek als diagnostisch hulpmiddel

Weefselcultures lenen zich uitstekend voor het aantonen van virussen. De veranderingen die door infectie met een virus in een monolaag ontstaan, zijn gemakkelijk met behulp van een microscoop te volgen. Het afwijkende beeld dat men na verloop van tijd waarneemt, het zg. cytopathogene effect of korthedshalve

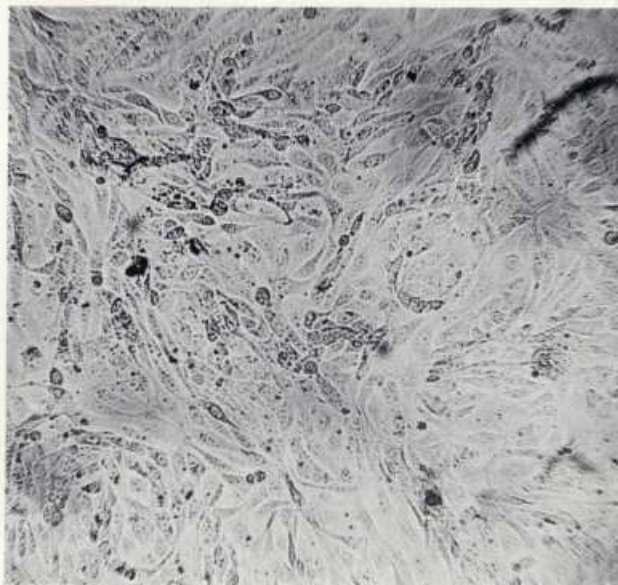


Fig. 1. Microfoto van een weefselcultuur van hondenier. De kweek is één cel dik, een zg. monolaag. Vergroting 100×.

CPE, vertoont voor de meeste virussen een karakteristiek patroon (fig. 2). Op grond van deze karakteristiek kunnen de meeste virussen van elkaar worden onderscheiden.

De weefselkweek is voor de diagnostiek dan ook een waardevol hulpmiddel geworden. De methode heeft bovendien reeds geleid tot de ontdekking van ziekteverwekkende virussen die men met andere methodes niet had kunnen vinden, b.v. de verwekker van de infectieuze rhinotracheitis bij runderen. Tot omstreeks 1956 was de aard van deze ziekte onbekend. Vermoedens dat een virus hiervoor aansprakelijk was, konden noch met dierproeven, noch met kweek op kippe-eieren bevestigd worden. Een kweek op een embryonaal rundernierweefsel bracht het virus uiteindelijk aan het licht. Na deze ontdekking kon men na korte tijd reeds een vaccin tegen deze ziekte ontwikkelen en op de markt brengen.

Is het ziekteverwekkende virus bekend, dan staan er, zoals reeds aangestipt, twee wegen open voor de bereiding van de vaccins: men kan geïnactiveerde dan wel levende vaccins maken. Op de bereiding van geïnactiveerde vaccins willen we hier niet ingaan, het zij

voldoende te vermelden dat een geschikte kweekmethode moet worden gevonden voor de produktie van de virussen. Was men hiervoor vroeger vrijwel uitsluitend aangewezen op kippeëieren, tegenwoordig bestaat er, zoals we gezien hebben, een ruimere keuze van weefsels.

Voor de bereiding van levende avirulente vaccins is de mogelijkheid van weefselkweek van nog veel grotere betekenis. Het uitslecteren van een ongevaarlijke variant van een bepaald virulent virus gebeurt namelijk door verscheidene generaties van het virus te kweken op een voor de virussoort *vreemde gastheer*. Dat dit meestal tot het gewenste resultaat leidt, zou men als volgt kunnen begrijpen. Naast het virulente, zich snel vermenigvuldigende virus komen in een viruspopulatie ook minder virulente mutanten voor, doch hun bestaan wordt geheel overschaduwd door het virulente virus. Dit kan veranderen als men het virus overbrengt op een andere gastheer: een of meer van de minder virulente varianten blijken zich gemakkelijker aan te passen aan het nieuwe milieu dan de virulente varianten, en zij worden op hun beurt virulent voor de nieuwe gastheer en gaan domineren. Door dit procédé een aantal malen te herhalen — dus steeds een klein deel van de veranderde virusbevolking over te brengen in het vreemde milieu — houdt men uiteindelijk een virusbevolking over waaruit het virulente soort voor de eigen gastheer nagenoeg verdwenen is.

Het is duidelijk dat de beschreven methode niet bij elke gastheer tot een succes leidt. Toen men alleen nog op kippeëieren kweekte, slaagde men dan ook niet altijd in de ontwikkeling van levende avirulente vaccins. De weefselkweek met zijn grote verscheidenheid aan gastheren biedt in dit opzicht veel meer mogelijkheden.

Voor de ontwikkeling van levende avirulente vaccins is het niet alleen van belang dat de verkregen virusmutant avirulent is, maar tevens dat deze aan de oorspronkelijke gastheer een immuniteit geeft die niet of weinig onderdoet voor die welke ontstaat wanneer een individu een virulente infectie overleeft.

Men zou zich erover kunnen verwonderen dat het in principe mogelijk is een virus met een dergelijke combinatie van eigenschappen te vinden. We willen hier niet te diep op ingaan, doch slechts vermelden dat deze mogelijkheid verband houdt met het feit dat de kern van het virus de mate van virulentie en andere erfelijke eigenschappen van het virus bepaalt, terwijl de eiwitmantel van het virus betrokken is bij de vorming van de (eveneens eiwitachtige) antistoffen bij de

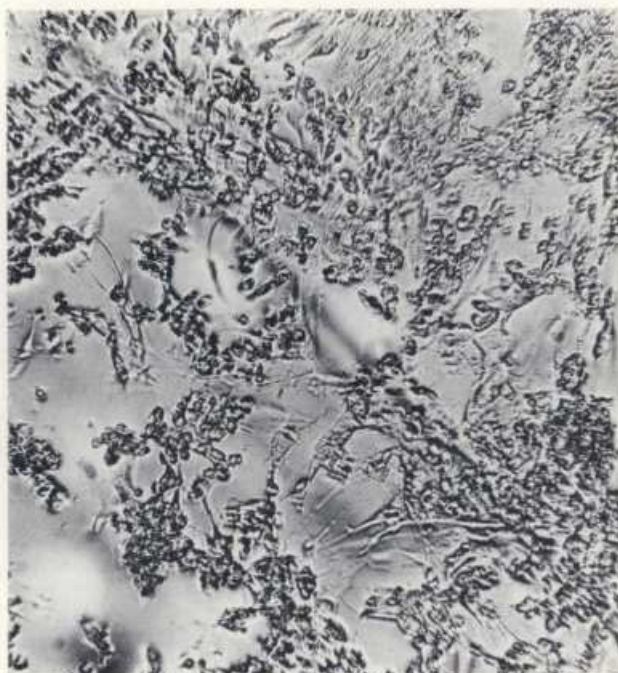


Fig. 2. Monolagen van hondenier aangetast door a) infectieuze honde-hepatitisvirus, b) hondeziektevirus. Dit cytopathogene effect (CPE) is in het algemeen zo karakteristiek voor het virus waardoor het wordt veroorzaakt, dat op grond hiervan identificatie mogelijk is. Vergroting 100 $\times$ .

gastheer en dus de immuniserende eigenschappen bepaalt.

Uit het bovenstaande is wel duidelijk dat men bij de ontwikkeling van een levend avirulent vaccin telkens zal moeten nagaan wat de mate van de verkregen immuniteit is. De immuniteit die een bepaald vaccin geeft, wordt met behulp van een weefselkweek globaal be-

[2] J. F. Morgan, H. J. Morton en R. C. Parker, Proc. Soc. exper. Biol. and Med. **73**, 1, 1950.

[3] G. O. Gey, W. D. Coffman en M. T. Kubicek, Cancer Research **12**, 264, 1952.

paald met de zg. serumneutralisatietest. Men onttrekt hierbij wat bloed aan een dier, geënt met een bepaald vaccin, en men vult een aantal reageerbuizen met verschillende verdunningen van het daaruit bereide serum, b.v. 1:10, 1:100, enz. Aan elke verdunning voegt men een bepaalde hoeveelheid van het desbetreffende virus toe, en men gaat na — door van elke verdunning een weinig op een monolaag te brengen — bij welke graad van verdunning het CPE niet of nauwelijks optreedt. Die graad van verdunning is dan een maat voor de bereikte immuniteit tegen het toegevoegde virus.

#### Weefselkweek versus kweek op kippeïeren

We kunnen thans overzien wat de belangrijkste voordelen zijn van weefselkweek vergeleken met kweek op kippeïeren.

- 1) Een grotere verscheidenheid aan virussen kan gekweekt worden.
- 2) De mate van immuniteit die met vaccins bereikt kan worden, laat zich gemakkelijk aan de hand van het CPE vaststellen. Het CPE is eveneens een eenvoudig hulpmiddel bij de identificatie van virussen.

- 3) Vaccins bereid op weefselcultures bevatten vrijwel geen eiwit. Dit is van belang, aangezien vaccins die op kippeïeren zijn gekweekt, slechts met inachtneming van bepaalde voorzorgen gebruikt kunnen worden voor diegenen die allergisch zijn voor kippeiwit.
- 4) De produktie van virussen levert weinig problemen op. De zich vermenigvuldigende virussen barsten uiteindelijk uit de cellen van de weefselcultures en komen dan in het voedingsmedium terecht. Het zuiveren van de virussen is bij weefselkweek vrijwel nooit nodig, wegens de afwezigheid van eiwit. Hoogstens worden celresten verwijderd door filteren of centrifugeren.

---

**Samenvatting.** De profylaxe met behulp van vaccins is heden ten dage nog steeds van zeer groot belang, in het bijzonder ter voorkoming van virusziekten. In het artikel wordt aandacht gegeven aan de methode om virusvaccins te bereiden op weefselcultures, welke methode zich de laatste jaren een plaats veroverd heeft naast de methode om virussen op bebroede kippeïeren te kweken. Door de nieuwe methode is men in staat gesteld enkele nieuwe vaccins te ontwikkelen, o.m. tegen polio en mazelen en tegen verschillende honde- en runderziekten.



## Vitamines in de veevoeding

Th. J. de Man

### Vitamines

Wanneer men de in de veevoedingspraktijk gebruikte tabellen over de samenstelling van voedermiddelen bestudeert, onderkent men dat de routinemethode waarop de cijfers in deze tabellen berusten (de reeds een eeuw oude, zg. „Weender methode” van Henneberg en Stohmann), neerkomt op een verdeling van elk produkt in: vocht, asbestanddelen, eiwitachtige stoffen, vetachtige stoffen, ruwe celstof en zetmeelachtige stoffen.

Deze Weender methode is als een afspiegeling van de zg. klassieke voedingsleer te beschouwen. Hierin werden, naast de eiwitten, vetten en koolhydraten, slechts een beperkt aantal mineralen als voor de voeding noodzakelijk beschouwd (kalium, natrium, calcium, magnesium, ijzer, chloor, fosfor en zwavel). Deze klassieke voedingsleer heeft zich, in grote trekken

tenminste, lang kunnen handhaven, en met de jaren waarin zij haar hoogtepunt had, valt ook de bloei samen van een energetische beschouwingswijze, welke in de toen gebruikelijke vorm neerkwam op een vergelijking tussen dierlijk organisme en machine. Men dient zich echter terdege bewust te zijn van de zeer beperkte waarde van zulk een vergelijking, daar het zeer moeilijk is zich een machine voor te stellen welke niet alleen, al naar het aanbod, genoeg neemt met hout, turf, antraciet, cokes, benzine of ruwe olie als brandstof, maar die tevens deze brandstofsoorten zelf tot een constructiemateriaal weet om te bouwen zonder dat de produktie stagneert, en die later, indien nodig, een deel van dit constructiemateriaal weer als brandstof kan gebruiken. Overgebracht in deze voor machines gebruikelijke termen is het dierlijk organisme tot dit alles in staat.

Langs verschillende wegen is men tot de overtuiging gekomen dat in de voeding behalve eiwitten, vetten

*Dr. Th. J. de Man, medewerker van N.V. Philips-Duphar te Amsterdam.*

en koolhydraten en enkele zouten nog geheel andere stoffen als onontbeerlijk zijn te beschouwen. Op de meest directe weg vindt men dierexperimenten waarbij werd aangetoond dat een voeding, slechts bestaande uit bovenstaande componenten in zuivere vorm, niet voldoende was om de proefdieren in optimale condities te houden. De oorsprong van de andere weg van onderzoek is niet aan te geven, maar ligt in ieder geval reeds eeuwen terug. Men zou kunnen zeggen dat deze weg gemarkeerd is door punten waarbij men steeds duidelijker inzicht kreeg in het feit dat een aantal ziekten het gevolg zijn van tekortkomingen in de voeding. De in verband met deze ontwikkeling belangrijkste ziekten waren scheurbuik, beriberi, rachitis of Engelse ziekte, en pellagra. De grote verdienste van Funk (en vooral hierdoor heeft zijn beroemde publikatie in 1912 een zo grote aandacht getrokken <sup>[1]</sup>) is geweest dat hij bovenstaande ziekten werkelijk als gebreks-ziekten heeft gezien, nl. als gevolg van tekorten aan resp. antischeurbuik-vitamine, antiberiberi-vitamine, antirachitis-vitamine en antipellagra-vitamine. Ook hield hij toen reeds met de mogelijkheid rekening dat deze vier vitamines wel geheel verschillende verbindingen konden zijn.

Interessant is overigens op te merken dat wat beriberi betreft de Nederlander Grijns reeds in 1901 een duidelijk inzicht had in het deficiëntie karakter van deze ziekte. Voor de eerste maal werd door hem naar voren gebracht dat beriberi ten gevolge van gebrek aan bepaalde stoffen (of aan één stof) in de geslepen rijst optrad en dat de noodzakelijke stoffen in de zemelen aanwezig waren. In 1912 dacht Funk ten onrechte dat hij het zuivere antiberiberi-vitamine in handen had gekregen. Dit lukte echter pas in 1926, en wel aan de Nederlanders Jansen en Donath, die in dat jaar de zuivere stof uit rijstzemelen wisten te isoleren.

Het is puur toeval geweest, maar toch is het feit niet zonder symboliek, dat de isolering van dit eerste vitamine (vitamine B<sub>1</sub>) en de isolering van het eerste enzym (urease) in hetzelfde jaar 1926 plaatsvonden. Reeds vroeg heeft men intuïtief een verband gelegd tussen de werkzaamheid van vitamines en die van enzymen. Het feit dat vitamines in zeer kleine hoeveelheden hun werkzaamheden ontplooiën, maakt het ook wel enigszins voor de hand liggend, te zoeken in de richting van een katalyserende functie. Voor de meeste vitamines is thans door uitgebreide onderzoeken vast komen te staan dat zij essentiële onderdelen (co-enzymen) zijn van de diverse fundamentele enzymsystemen die de stofwisseling van de levende cel regelen.

Met de isolering van het genoemde antiberiberi-vitamine (B<sub>1</sub>, aneurine, thiamine) in zuivere toestand was een lange weg van succesrijke isoleringen en zuiveringen geopend. Uitgaande van de klassieke voedingsleer

is men in relatief zeer korte tijd gekomen tot de onderkenning van ongeveer 50 voor de voeding noodzakelijke verbindingen, de zg. nutriënten. Van dit aantal maken de vitamines een groot gedeelte uit, naast essentiële aminozuren en sporenelementen.

De belangrijkste vitamines zijn in *tabel I* vermeld, waarbij een onderscheid is gemaakt tussen in vet oplosbare en in water oplosbare vitamines. Behalve vitamine C behoren alle genoemde in water oplosbare vitamines tot het zg. vitamine-B-complex.

In betrekkelijk korte tijd slaagde men erin van de meeste vitamines ook de chemische structuur op te helderen. In enkele gevallen bleek het vitamine (tot verrassing van de onderzoekers) identiek met een reeds lang bekende scheikundige verbinding. Dit was b.v. het geval met het antipellagra-vitamine, dat identiek met het reeds als stof bekende nicotinezuur (nicotinezuuramide) bleek te zijn.

**Tabel I.** De belangrijkste vitamines.

| In vet oplosbaar                      | In water oplosbaar                                                  |
|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Vitamine A (axeroftol)                | Vitamine B <sub>1</sub> (thiamine, aneurine, antiberiberi-vitamine) |
| Vitamine D (antirachitisch vitamine)  | Vitamine B <sub>2</sub> (riboflavine, lactoflavine)                 |
| Vitamine E (tocoferolen)              | Nicotinezuur (PP-factor, antipellagra-vitamine)                     |
| Vitamine K (antihemoragisch vitamine) | Pantotheenzuur (vitamine B <sub>3</sub> )                           |
|                                       | Vitamine B <sub>6</sub> (pyridoxine, adermine)                      |
|                                       | Biotine (vitamine H)                                                |
|                                       | P-aminobenzoëzuur (P.A.B.A.)                                        |
|                                       | Inositol                                                            |
|                                       | Foliumzuur                                                          |
|                                       | Choline                                                             |
|                                       | Vitamine B <sub>12</sub> (cyanocobalamine)                          |
|                                       | Vitamine C (ascorbinezuur, antischeurbuik-vitamine)                 |

Na de structuuropheldering volgden in het algemeen pogingen om het vitamine kunstmatig te maken, liefst op industriële schaal, ten einde over een voldoende goedkope bereidingswijze te kunnen beschikken om een algemene, economisch verantwoorde, toepassing mogelijk te maken. *Tabel II* geeft een lijstje van de belangrijkste vitamines met het jaar waarin een dergelijke

<sup>[1]</sup> J. Funk, *State Med.* **20**, 341, 1912.

<sup>[2]</sup> Men zie b.v. de talrijke publikaties die sinds ongeveer 1929 hierover zijn verschenen van de hand van o.m. E. H. Reerink, A. van Wijk, J. Boer en J. van der Vliet in *Rec. Trav. chim. Pays-Bas*, alsmede verschillende dissertaties die onder leiding van prof. dr. E. Havinga (Laboratorium voor Organische Chemie te Leiden) zijn geschreven.

<sup>[3]</sup> Men zie b.v. de publikaties van H. O. Huisman en medewerkers in *Rec. Trav. chim. Pays-Bas*.

Tabel II. Vitamines en het jaar van hun synthese.

|                         |                     |                         |                      |
|-------------------------|---------------------|-------------------------|----------------------|
| Vitamine D <sub>2</sub> | 1931                | Vitamine K <sub>1</sub> | 1939                 |
| Vitamine C              | 1933                | Vitamine K <sub>3</sub> | 1939 <sup>[**]</sup> |
| Vitamine B <sub>2</sub> | 1935                | Pantotheenzuur          | 1940                 |
| Vitamine B <sub>1</sub> | 1936                | Inositol                | 1940 <sup>[*]</sup>  |
| Nicotinezuur            | 1937 <sup>[*]</sup> | P-aminobenzoëzuur       | 1941 <sup>[*]</sup>  |
| Vitamine D <sub>3</sub> | 1937                | Choline                 | 1941 <sup>[*]</sup>  |
| Vitamine E              | 1938                | Biotine                 | 1944                 |
| Vitamine B <sub>6</sub> | 1939                | Foliumzuur              | 1946                 |
|                         |                     | Vitamine A              | 1947                 |

[\*] In het genoemde jaar als vitamine herkend.

[\*\*] Vaststelling van antihemorragische activiteit.

kunstmatige scheikundige bereiding mogelijk bleek.

De N.V. Philips-Duphar heeft in het bijzonder een belangrijke rol gespeeld bij de industriële productie van vitamine D <sup>[2]</sup> en van vitamine A <sup>[3]</sup>. Van het eerste vitamine is deze onderneming thans de voornaamste producent in de wereld.

Vitamines worden tegenwoordig op grote schaal aan veevoer toegevoegd. Ten behoeve van onderzoek op

dit gebied is door de N.V. Philips-Duphar in de buurt van Muiden een proefboerderij opgezet, „Hoogerlust” genaamd (fig. 1). Op dit bedrijf worden voedingsproeven uitgevoerd met pluimvee, varkens, rundvee en schapen onder omstandigheden welke zoveel mogelijk gelijk zijn aan die in de praktijk. Deze proeven hebben voornamelijk betrekking op stoffen, zoals vitamines, antibiotica en enzymen, die in kleine hoeveelheden aan het voer worden toegevoegd ter verkrijging van optimale economische resultaten.

#### De gewenste hoeveelheden vitamines in het veevoer

De bij tekorten aan een of meer vitamines klinisch waargenomen en in de literatuur beschreven deficiëntieverschijnselen komen in hun zuivere vorm bij de veehouderij niet zo heel vaak voor, aangezien ze pas optreden wanneer de tekorten relatief reeds groot zijn en vooral wanneer deze eenzijdig een bepaald vitamine betreffen. Bij geringe tekorten (in de praktijk meestal niet eenzijdig) bevindt men zich bij de mens in het gebied tussen ziekte en stralende gezondheid, een gebied dat groter is dan men meestal beseft. Bij onze landbouwhuisdieren kan men bij de geringere tekorten (hypovitaminosen) vaak niet veel meer zeggen dan dat

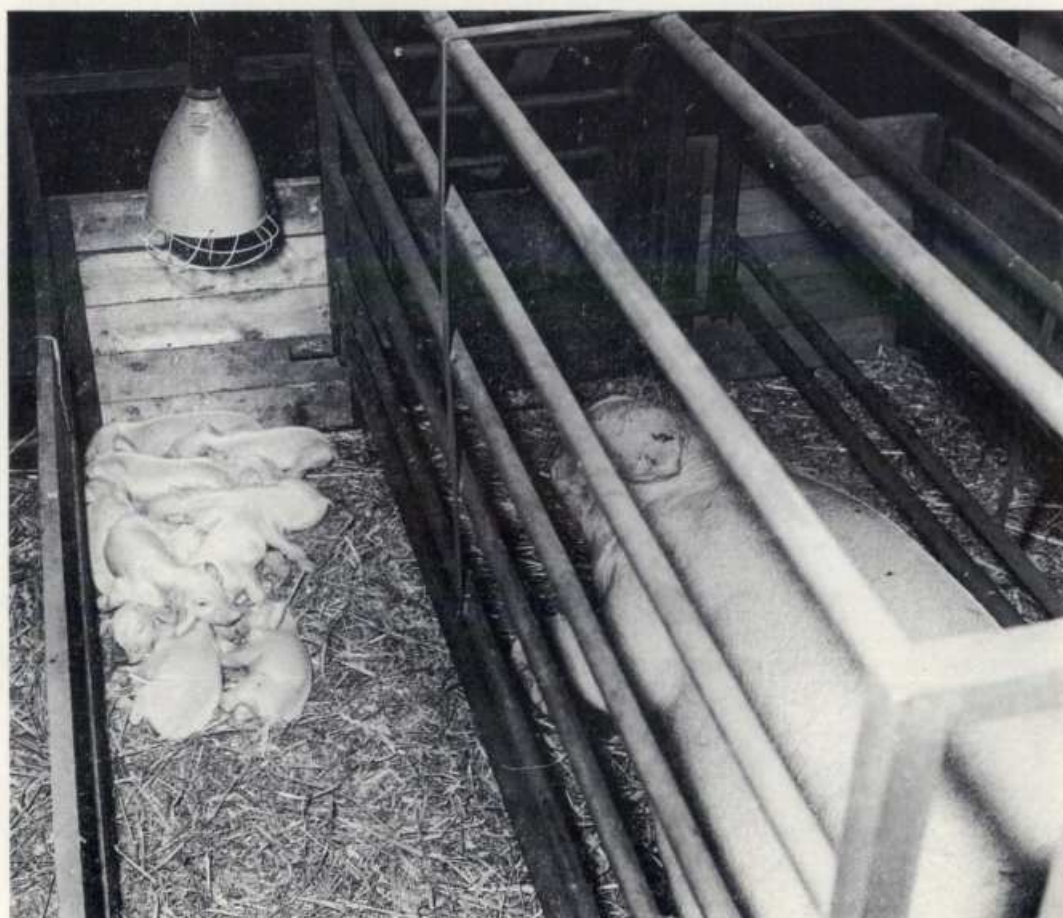


Fig. 1. Kijkje in de proefboerderij „Hoogerlust” te Muiden: zeug met biggen in kraamhok.

de dieren „het niet goed doen”. Economisch komt dat tot uiting in ongunstige fokresultaten, slechte groei, ongunstige voederbenutting, lage produktie en geringe weerstand tegen allerlei ziekten.

Men kan niet zonder meer van verschillen in belangrijkheid tussen de diverse vitamines spreken. Ieder lid van deze groep nutriënten is even belangrijk, in die zin dat bij een tekort aan ieder een optimale gezondheid onmogelijk wordt. Hoogstens kan men zeggen (en dit is voor de praktijk juist zeer belangrijk) dat ten aanzien van bepaalde vitamines tekorten eerder en veelvuldiger optreden dan ten aanzien van andere.

In tabel III hebben we de hoeveelheden vitamines opgegeven die volgens onze opvatting gewenst zijn in de rantsoenen van een aantal landbouwhuisdieren. Bij beschouwing van deze tabel dient men er zich bewust van te zijn dat dit slechts de weergave van gemiddelden betekent. De behoefte aan vitamines is nl. van vele factoren afhankelijk, b.v. van de wijze waarop de dieren gehouden worden, van de samenstelling van de rantsoenen, van de gezondheidstoestand, e.d. De behoeften kunnen ten dele ook door allerlei erfelijke factoren beïnvloed worden. Voorts kan men algemeen stellen dat de behoeften aan in de voeding noodzakelijke bestanddelen sterk afhangen van datgene wat men van de dieren eist. Iedere poging tot verdere intensivering

van de (pluim)veehouderij, iedere poging tot verder opvoeren van de produktie of van de groeisnelheid is tot mislukken gedoemd wanneer men geen rekening houdt met de noodzaak dit samen te laten gaan met een verhoging van het aanbod aan nutriënten.

#### Veevoeders en vitaminepreparaten en hun utilisatie door het dier

In tabel IV zijn de vitaminegehalten van een aantal in de veevoeding gebruikelijke voedermiddelen gegeven. Ook hierbij dient men er rekening mee te houden dat het slechts om gemiddelde waarden gaat.

In het algemeen zal men aan een chemische of een fysische bepaling van het vitaminegehalte de voorkeur geven boven een bepaling welke berust op de uitwerking op het dier, een zg. biologische ijking, aangezien ze minder tijd en kosten vereisen en aangezien de spreiding in de uitkomsten kleiner is. Toch dient men zich steeds de vraag te stellen of de waardering door de man in het laboratorium wel parallel loopt met de waardering door het dier. Om dit laatste gaat het, wat de praktische toepassing van produkten (en preparaten) in de veevoeding betreft, natuurlijk uiteindelijk, daar het dier ten slotte in de praktijk zijn oordeel kenbaar maakt door het niveau van zijn prestaties. Vooral bij de beoordeling van een aantal vitaminepreparaten moet

**Tabel III.** Gewenste hoeveelheden vitamines in het voer. De gegevens boven de dubbele streep zijn vermeld per kg totaal (op luchtdroog omgerekend) voer, die er beneden per kg levend gewicht per dag. Voor vitamine E zijn de getallen tussen haakjes gegeven; de behoeften aan dit vitamine zijn zeer variabel, o.a. zeer sterk afhankelijk van de rest van het rantsoen. Met het teken + wordt bedoeld dat er een behoefte bestaat, maar dat de beschikbare gegevens nog niet een kwantitatieve opgave rechtvaardigen.

|                                             | Vit. A | Vit. D <sub>3</sub> | Vit. E | Vit. K | Vit. B <sub>1</sub> | Vit. B <sub>2</sub> | Nico-<br>tine-<br>zuur | Panto-<br>theen-<br>zuur | Vit. B <sub>6</sub> | Cho-<br>line | Vit. B <sub>12</sub> | Bio-<br>tine | Fo-<br>lium-<br>zuur |
|---------------------------------------------|--------|---------------------|--------|--------|---------------------|---------------------|------------------------|--------------------------|---------------------|--------------|----------------------|--------------|----------------------|
|                                             | I.E.   | I.E.                | I.E.   | mg     | mg                  | mg                  | mg                     | mg                       | mg                  | mg           | µg                   | mg           | mg                   |
| Kuikens, 0-8 weken                          | 7500   | 750                 | (10)   | 0,6    | 2,2                 | 4,5                 | 35                     | 12                       | 3,5                 | 1500         | 10                   | 0,15         | 0,8                  |
| Kuikens, 8-18 weken                         | 6000   | 600                 | (8)    | 0,4    | 2,0                 | 3,5                 | 30                     | 10                       | 3,0                 | 1250         | 8                    | 0,12         | 0,6                  |
| Mestkuikens                                 | 9000   | 1000                | (10)   | 1,0    | 2,5                 | 5,0                 | 40                     | 14                       | 3,8                 | 1500         | 10                   | 0,15         | 0,8                  |
| Leghennen                                   | 7500   | 1000                | (8)    | 0,4    | +                   | 3,0                 | +                      | 8                        | 3,5                 | 1100         | 4                    | +            | 0,3                  |
| Fokhennen                                   | 10000  | 1200                | (10)   | 0,4    | +                   | 4,5                 | +                      | 11                       | 4,0                 | 1100         | 6                    | +            | 0,4                  |
| Kalkoenkuikens, 0-8 weken                   | 12000  | 1500                | (12)   | 1,0    | +                   | 5,0                 | 70                     | 14                       | 3,8                 | 2000         | 10                   | +            | 1,2                  |
| Kalkoenkuikens, 8-18 weken                  | 10000  | 1200                | (10)   | 0,8    | +                   | 4,0                 | 60                     | 12                       | 3,5                 | 1500         | 8                    | +            | 1,0                  |
| Fokkalkoenen                                | 12000  | 1500                | (15)   | 0,6    | +                   | 4,5                 | 50                     | 14                       | 4,0                 | 1500         | 8                    | +            | 1,0                  |
| Slachteenden                                | 9000   | 1000                | +      | +      | +                   | 5,0                 | 50                     | 12                       | 3,5                 | 1500         | 10                   | +            | +                    |
| Babybiggen, <15 kg                          | 4000   | 500                 | (12)   | +      | 1,5                 | 3,5                 | 25                     | 14                       | 1,7                 | 1100         | 15                   | +            | +                    |
| Biggen, >15 kg                              | 3000   | 400                 | (10)   | +      | 1,3                 | 3,0                 | 20                     | 12                       | 1,5                 | 1000         | 10                   | +            | +                    |
| Drachtige en lacterende<br>zeugen; fokberen | 3500   | 400                 | (15)   | +      | 1,3                 | 3,5                 | 15                     | 12                       | +                   | +            | +                    | +            | +                    |
| Kalveren                                    | 5000   | 750                 | (15)   | +      | +                   | +                   | +                      | +                        | +                   | +            | +                    | +            | +                    |
| Veulens                                     |        |                     |        |        |                     |                     |                        |                          |                     |              |                      |              |                      |
| Lammeren                                    |        |                     |        |        |                     |                     |                        |                          |                     |              |                      |              |                      |
| Groeiende nertsen                           | 15000  | 1500                | (25)   | +      | 5                   | 8                   | 40                     | 15                       | 2,5                 | +            | 50                   | 0,15         | 1                    |
| Babybiggen, <15 kg                          | 300    | 40                  | (0,9)  | +      | 0,13                | 0,28                | 2,0                    | 1,2                      | 0,14                | 90           | 1,3                  | +            | +                    |
| Biggen, >15 kg                              | 180    | 25                  | (0,6)  | +      | 0,08                | 0,18                | 1,2                    | 0,7                      | 0,09                | 60           | 0,6                  | +            | +                    |
| Kalveren                                    | 100    | 15                  | (0,3)  | +      | +                   | +                   | +                      | +                        | +                   | +            | +                    | +            | +                    |

**Tabel IV.** Vitaminegehalten per kg van een aantal voedermiddelen. Het cijfer 0 kan ook betekenen dat de hoeveelheid zo gering is dat er in de praktijk geen rekening mee kan worden gehouden. Het teken + duidt een niet te verwaarlozen aanwezigheid van het desbetreffende vitamine aan waarbij echter de beschikbare gegevens een kwantitatieve weergave niet rechtvaardigen.

| Voedermiddel       | Vit. A<br>I.E. | $\beta$ -caro-<br>teen<br>mg | Vit. D<br>I.E. | Vit. E<br>I.E. | Vit. B <sub>1</sub><br>mg | Vit. B <sub>2</sub><br>mg | Nico-<br>tine-<br>zuur<br>mg | Panto-<br>theen<br>zuur<br>mg | Vit. B <sub>6</sub><br>mg | Cho-<br>line<br>mg | Vit. B <sub>12</sub><br>$\mu$ g | Bio-<br>tine<br>mg | Fo-<br>lium-<br>zuur<br>mg | Vit. C<br>mg |
|--------------------|----------------|------------------------------|----------------|----------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------------|--------------------|---------------------------------|--------------------|----------------------------|--------------|
| Boekweit           | 0              | 0                            | 0              | +              | +                         | 1,0                       | 40                           | 10                            | +                         | 450                | 0                               |                    |                            | 0            |
| Gerst              | 0              | 0                            | 0              | 6              | 4                         | 1,2                       | 30                           | 7                             | 4                         | 1000               | 0                               | 0,1                | 0,6                        | 0            |
| Haver              | 0              | 0                            | 0              | 5              | 6                         | 1,1                       | 12                           | 10                            | 3                         | 900                | 0                               | 0,2                | 0,2                        | 0            |
| Maïs, gele         | 0              | 2                            | 0              | 5              | 4                         | 1,0                       | 12                           | 6                             | 4                         | 450                | 0                               | 0,1                | 0,2                        | 0            |
| Maïsglutenmeel     | 0              | 6                            | 0              | +              | 0,2                       | 1,5                       | 45                           | 9                             | 7                         | 300                | 0                               | 0,1                | 0,2                        | 0            |
| Maïsglutenvoermeel | 0              | 3                            | 0              | +              | 2                         | 2,0                       | 60                           | 14                            | 12                        | 1300               | 0                               | 0,2                | 0,2                        | 0            |
| Maïsvoermeel       | 0              | 1                            | 0              | +              | 8                         | 2,0                       | 40                           | 8                             | 10                        | 900                | 0                               | 0,2                | 0,3                        | 0            |
| Millet             | 0              | 0                            | 0              | +              | 1,5                       | 1,0                       | 25                           | 10                            | 3                         | 450                | 0                               | 0,1                | 0,15                       | 0            |
| Milo               | 0              | 0                            | 0              | 6              | 4                         | 1,0                       | 30                           | 10                            | 4                         | 500                | 0                               | 0,2                | 0,2                        | 0            |
| Rogge              | 0              | 0                            | 0              | 10             | 3                         | 1,2                       | 12                           | 7                             | 3                         | 450                | 0                               | 0,05               | 0,6                        | 0            |
| Ruwe rijst         | 0              | 0                            | 0              | 6              | 3                         | 1,0                       | 30                           | 8                             | 4                         | 900                | 0                               | 0,1                | 0,4                        | 0            |
| Tarwe              | 0              | 0                            | 0              | 10             | 4                         | 1,0                       | 50                           | 10                            | 4                         | 900                | 0                               | 0,1                | 0,4                        | 0            |
| Tarwekiemmeel      | 0              | 0                            | 0              | 100            | 18                        | 5                         | 25-50                        | 12                            | 12                        | 3000               | 0                               |                    | 1,5                        | 0            |
| Tarwezemelen       | 0              | 0                            | 0              | 15             | 8                         | 3                         | 50-100                       | 20                            | 12                        | 1200               | 0                               | 0,1                | 1,5                        | 0            |
| Grondnotenschroot  | 0              | 0                            | 0              | +              | 7                         | 4                         | 150                          | 50                            | 6                         | 1750               | 0                               | 0,3                | 0,6                        | 0            |
| Katoenzaadschroot  | 0              | 0                            | 0              | +              | 4                         | 4                         | 30                           | 10                            | 5                         | 2750               | 0                               | 0,6                | 1                          | 0            |
| Kokosschroot       | 0              | 0                            | 0              | +              | 1                         | 3                         | 30                           | 6                             | 3                         | 1100               | 0                               |                    | 1                          | 0            |
| Lijnzaadschroot    | 0              | 0                            | 0              | +              | 7                         | 3                         | 35                           | 7                             | 6                         | 1400               | 0                               |                    | 3                          | 0            |
| Sesamschroot       | 0              | 0                            | 0              | +              | 3                         | 3                         | 30                           | 6                             | 6                         | 1500               | 0                               | 0,3                | 1                          | 0            |
| Sojaschroot        | 0              | 0                            | 0              | +              | 4                         | 4                         | 30                           | 14                            | 6                         | 2750               | 0                               | 0,2                | 0,6                        | 0            |
| Diermeel           | 0              | 0                            | 0              | 0              | 0,5                       | 3                         | 40                           | 2                             | +                         | 1500               | 10-50                           |                    |                            | 0            |
| Vismee             | +              | 0                            | +              | 0              | 0,5                       | 6                         | 60                           | 6                             | 3                         | 1500               | 25-100                          | 0,1                | 0,1                        | 0            |
| Vis solubles cond. | 0              | 0                            | 0              | 0              | 5                         | 12                        | 150                          | 35                            | 10                        | 2500               | 50-200                          | 0,1                | 0,2                        | 0            |
| Melk, verse        | 200-1000       | 0,1-0,3                      | 3-25           | 0,5            | 0,4                       | 1,5                       | 1                            | 3                             | 1                         | 100                | 4                               | 0,03               | 0,1                        | 18           |
| Ondermelkpoeder    | 0              | 0                            | 0              | 0              | 4                         | 18                        | 10                           | 30                            | 5                         | 1000               | 30                              | 0,2                | 0,6                        | +            |
| Weipoeder          | 0              | 0                            | 0              | 0              | 4                         | 25                        | 10                           | 40                            | 5                         | 1500               | 15                              | 0,2                | 0,8                        | +            |
| Aardappelen, verse | 0              | 0                            | 0              | 1              | 1                         | 0,6                       | 10                           | 2                             | 1                         |                    | 0                               | 0,1                | 0,05                       | 50-200       |
| Biergist, gedroogd | 0              | 0                            | 0              | 0              | 25-100                    | 25-75                     | $\pm$ 400                    | 50-100                        | 25-50                     | 3000               | 0                               | 1,5                | 9                          | 0            |
| Gras, vers         | 0              | 15-75                        | 0              | $\pm$ 20       | 1                         | 2                         | 7                            | 2                             | 2                         | 200                | 0                               | 0,05               | 1                          | 500-1000     |
| Grasmeel           | 0              | 50-100                       | 0              | $\pm$ 100      | 3                         | 10                        | 30                           | 15                            | 9                         | 1250               | 0                               | 0,2                | 5                          | +            |
| Luzernemeel        | 0              | 50-100                       | 0              | $\pm$ 100      | 3                         | 10                        | 30                           | 20                            | 9                         | 1250               | 0                               | 0,2                | 5                          | +            |
| Melasse            | 0              | 0                            | 0              | 0              | 0                         | 1                         | 40                           | 2                             | 2                         | 600                | 0                               |                    |                            | 0            |
| Wortelen, verse    | 0              | 60-100                       | 0              | 5              | 0,5                       | 0,4                       | 2                            | 2                             | 1                         |                    | 0                               |                    | 0,05                       | 40-60        |

men vaak tot de overtuiging komen dat de uitkomsten van de scheikundige analyse beslist geen volledige weergave van de werkelijke waarde voor het dier kunnen vormen.

Zeër duidelijk komt dit b.v. bij vitamine A naar voren. Het blijkt dat na orale toediening van een bepaalde gewichtshoeveelheid vitamine A een groter percentage door het dier geresorbeerd wordt wanneer dit (in vet oplosbare) vitamine zich in de vorm van een „gesolubiliseerde oplossing in water” bevindt, dan wanneer de toediening door middel van een normale oplossing in olie plaatsheeft.

Dit feit heeft bij Philips-Duphar indertijd geleid tot de ontwikkeling van de zg. orale vitamine-AD<sub>3</sub>-stoot („Duphasol” [\*] AD<sub>3</sub>; „kalverstoot”), waarbij beide vitamines zich in waterige oplossing bevinden [4].

We raken met deze resorptiekwestie aan een alge-

mene problematiek die ook bij de ontwikkeling van farmaceutica en bij de ontwikkeling van pesticiden alle aandacht heeft. De waarde van een farmaceuticum of pesticide, en hetzelfde geldt voor een voedingsmiddel, hangt niet alleen af van de eigenlijke werkzame stof, maar eveneens van de zg. formulering van het preparaat. Onder formuleren wordt verstaan het brengen van dit bestanddeel in een zodanige vorm dat het zo doeltreffend mogelijk werkt. In een tweetal artikelen elders in dit nummer komen verschillende aspecten van dit vraagstuk aan de orde [5].

Ook bij de beoordeling van voor de mengvoeder-

[\*] Geregistreerd handelsmerk van N.V. Philips-Duphar.

[4] Zie Th. J. de Man, J. R. Roborgh en E. J. ten Ham, T. Diergeneesk. 83, 380, 1958.

[5] A. Verloop, Beschikbaarheid van organische verbindingen in hogere planten, blz. 97, en W. Duyfjes, Het vernevelen van geconcentreerde dispersies van pesticiden, blz. 116.

industrie geschikte zg. mineraalstabiele droge A- (en AD<sub>3</sub>-) preparaten spelen deze resorptiekwesties een belangrijke rol. De desbetreffende preparaten zijn korrelvormige, door een „coating” tegen oxidatie en tegen inwerking van mineralen beschermde produkten. Dergelijke „coatings” kunnen belemmerend werken op de resorptie door het dier. Bij de ontwikkeling van de bedoelde vitaminepreparaten dient men derhalve de volle aandacht aan de utilisatie door het dier te schenken. Verlangd wordt een „coating” die een maximale stabiliteit geeft bij een minimale belemmering van de resorptie, en die bescherming biedt aan een preparaat dat op zichzelf ook maximaal benutbaar is voor het dier. Dit blijken moeilijk te combineren eisen te zijn.

Voor de aanpak van dit probleem is indertijd een wiskundig goed verwerkbare biologische ijking op vitamine A door middel van een kuikengroetest door ons uitgewerkt [6]. Mede met behulp van deze test is het in de laboratoria van Duphar gelukt preparaten van vitamine A en D te maken („Dohyfral” [\*] Extra), waarmee een goede stabilisering tegen oxidatie en inwerking van mineralen kon worden verkregen, terwijl de vitamines toch goed benutbaar bleken voor het dier. Zo goed dat de benutting door het dier hoger is dan bij de normale oplossing van de vitamines in olie.

Wanneer ten slotte nog vermeld wordt dat de verbinding vitamine A als zodanig grote verschillen kan vertonen, aangezien hier diverse zg. stereo-isomeren mogelijk zijn, welke grote verschillen in biologische activiteit bezitten, krijgt men een indruk van de gecompliceerdheid van het gehele vraagstuk en zal het duidelijk zijn dat het vermelden van het (door de scheikundige bepaalde) aantal eenheden op de label slechts zeer beperkte informatie geeft over de werkelijke waarde van een preparaat voor het dier.

Behalve voor een aantal vitamines is in tabel IV nog een kolom gereserveerd voor een „provitamine”. Reeds lang was opgevallen dat allerlei plantenmateriaal een vitamine-A-activiteit vertoont, en dat deze werkzaamheid moet schuilen in een aantal leden van een groep verbindingen, de zg. carotenoïde kleurstoffen. Deze kunnen door het dier zelf in vitamine A omgezet worden en zijn dan als provitamine op te vatten.

De grootste vitamine-A-activiteit vertoont het in tabel IV opgenomen  $\beta$ -caroteen; 0,6  $\mu$ g is qua activiteit gelijk te stellen met 1 I.E. vitamine A. Men dient er rekening mee te houden dat deze activiteitsrelatie tussen vitamine A en  $\beta$ -caroteen slechts geldt voor de speciale omstandigheden van een officiële rattegroetest waarbij bovendien beide verbindingen in een oplossing in olie werden verstrekt. Voor de veevoedingspraktijk ligt de situatie voor het provitamine echter veel ongunstiger, o.a. doordat het caroteen uit plantenmateriaal veel slechter geresorbeerd wordt dan uit een op-

lossing in olie, en doordat de meeste landbouwhuisdieren het provitamine veel slechter in het vitamine omzetten dan de rat. Wanneer men verder in aanmerking neemt dat deze omzetting in hoofdzaak in de darmwand plaatsvindt, zal het duidelijk zijn dat in alle gevallen waarin deze darmwand niet in uitstekende conditie is, de vitamine-A-waarde van deze provitamines beter geheel verwaarloosd kan worden (met name bij coccidiosis bij pluimvee, bij sterke infecties met andere inwendige parasieten, b.v. met wormen, en bij vitamine-A-deficiëntie).

### Vitaminering van het veevoer

Een van de moeilijkste opgaven in de veevoeding is om al de vitamines gedurende het gehele leven van de dieren, dus ook gedurende de prenatale periode, kwalitatief en kwantitatief steeds in voldoende mate ter beschikking te stellen.

In de praktijk dient men na te gaan in hoeverre de gewenste hoeveelheden vitamines (tabel III) gedekt kunnen worden door de gewone voeding (het basisrantsoen) en in hoeverre een deel door middel van vitaminepreparaten extra dient te worden bijgeleverd. De vraag blijft dan nog op welke wijze dit laatste het best kan geschieden. De beantwoording van deze vraag is niet slechts voor de veehouder en de pluimveehouder, maar evenzeer voor de fabrikant van mengvoeders en die van vitaminepreparaten van belang. Het is onze overtuiging dat aan de noodzaak tot extra-verstreking van vitamines, indien mogelijk, het best door een vitaminering van de mengvoeders kan worden voldaan. In de landen met een ontwikkelde mengvoederindustrie behoren de vitamines, naast de antibiotica en de coccidiostatica, tot de meest belangrijke toevoegingen (feed-additives).

Wanneer men een juiste vitaminering van mengvoeders in principe als de aantrekkelijkste mogelijkheid beschouwt om de dieren van de noodzakelijke extra-hoeveelheden vitamines te voorzien, dient men zich echter tegelijkertijd bewust te zijn van de beperkingen ervan. Ten eerste hangt de grens van deze mogelijkheid af van de plaats welke het mengvoer in het beeld van de totale voeding inneemt. Deze plaats is niet slechts voor diverse landen, maar zelfs voor verschillende streken en bovendien van jaar tot jaar (in verband met prijzen en oogstresultaten) zeer verschillend. Bovendien is de plaats welke het mengvoer in het totale rantsoen inneemt, zeer afhankelijk van de diersoort en enkele andere omstandigheden. Hier kan men globaal zeggen dat de rundveemengvoeders de geringste en de pluimveemengsels de grootste plaats in de totale rantsoenen in-

[\*] Geregistreerd handelsmerk van N.V. Philips-Duphar.

[6] Th. J. de Man, E. J. ten Ham, J. R. Roborgh en N. Zwiep, *Neth. J. agric. Sci.* 6, 237, 1958.

nemen, terwijl de varkensmengvoerders een tussenpositie bezetten.

Zonder meer zal duidelijk zijn dat het voor alle gevallen waarin het mengvoer slechts een betrekkelijk gering deel van het totale rantsoen uitmaakt, en vooral wanneer dit deel in grootte nog wisselt, zeer moeilijk zal zijn op een economisch verantwoorde wijze met behulp van een mengvoedervitaminering volledig aan de vitaminebehoeften van de dieren te voldoen. De situatie is echter zo dat zelfs wanneer de dieren voor hun voeding uitsluitend op normaal gevitamineerd mengvoer zijn aangewezen, het zin kan hebben om (naast dit mengvoer) nog over andere toedieningswegen voor extra-vitamines te kunnen beschikken. Dit is steeds het geval wanneer (door welke oorzaak dan ook) de behoeften aan een of meer vitamines afwijkend hoog liggen.

Een van de mogelijkheden waarover men dan de beschikking heeft, is de toepassing van een zg. orale vitaminestoot, waarvan hierboven reeds een voorbeeld werd genoemd. De bedoeling daarbij is de behoefte met behulp van een eenmalige toepassing voor geruime tijd te dekken. Voorwaarde hiertoe is (naast een goede resorptie van de in het preparaat aanwezige vitamines) de mogelijkheid van het dierlijk organisme tot een goede opslag (b.v. in de lever), waaruit naar behoefte geput kan worden.

In de praktijk wordt deze orale vitaminestoot veelvuldig toegepast voor de in vet oplosbare vitamines A, D<sub>3</sub> en E, welke hiertoe in een „gesolubiliseerde waterige oplossing” worden gebracht — deze mogelijkheid vermeldde we reeds voor de vitamines A en D<sub>3</sub> [4]. De componenten van het vitamine-B-complex komen o.i.

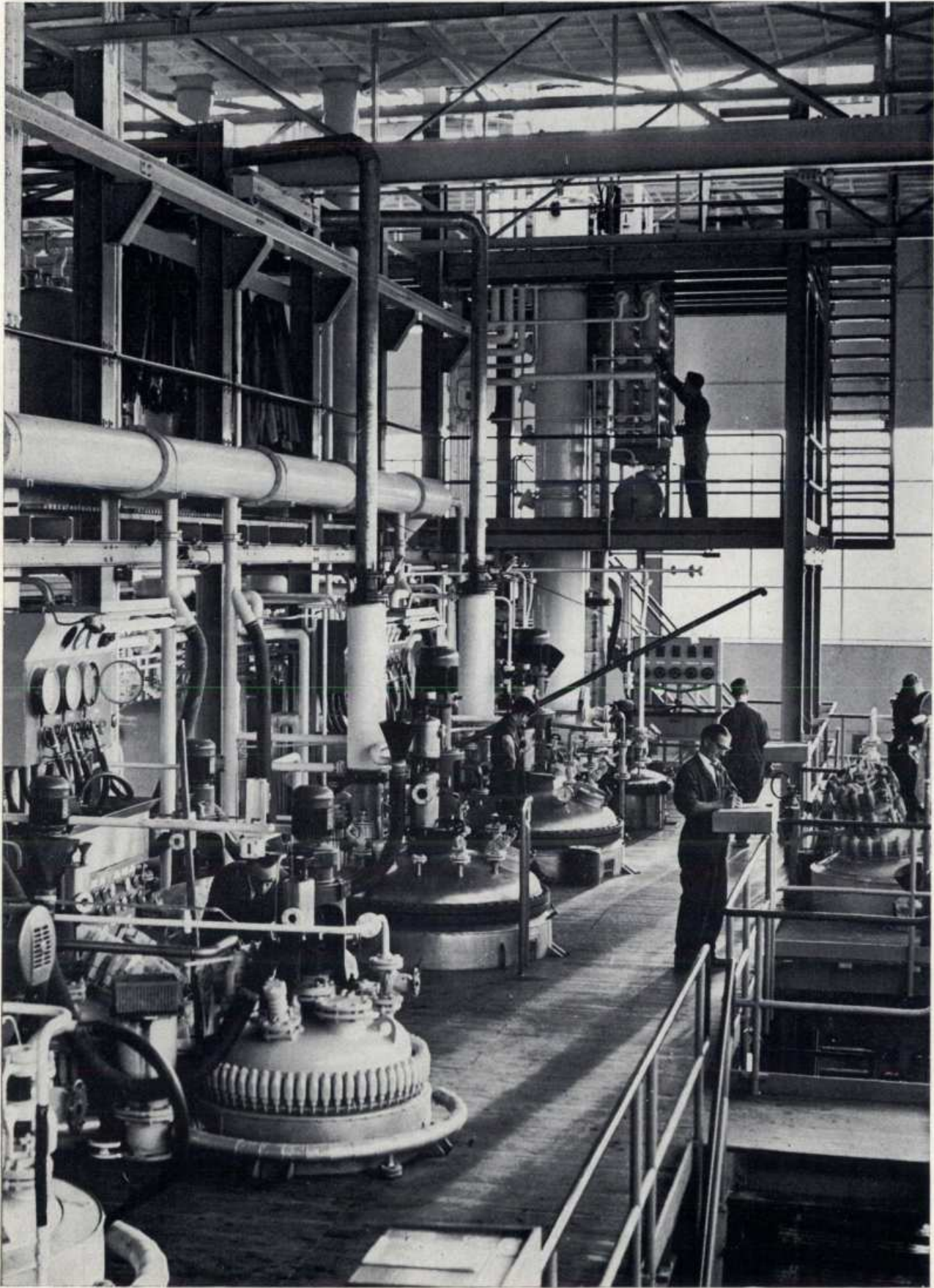
niet goed voor toepassing van een echte orale vitaminestoot in aanmerking. Het dierlijk organisme beschikt slechts over zeer beperkte opslagmogelijkheden voor de in water oplosbare vitamines, en het is dus duidelijk dat deze wijze van toediening van het vitamine-B-complex niet economisch zal zijn en geen zekerheid zal opleveren de dieren voor lange tijd tegen deficiënties te vrijwaren.

Wanneer men, door omstandigheden gedwongen, naast het gevitamineerde mengvoer toch extra B-vitamines aan de dieren heeft te verstrekken, zou men een toepassingsmogelijkheid kunnen kiezen waarbij gedurende een of meer weken een dagelijkse hoeveelheid wordt gegeven. Indien gewenst, zou een hiervoor te gebruiken preparaat (eventueel geheel in drinkwater oplosbaar) ook de in vet oplosbare vitamines en zo nodig ook sporenelementen en een antibioticum kunnen bevatten.

---

**Samenvatting.** Na een algemene inleiding over vitamines worden opgegeven de gewenste hoeveelheden vitamines in de veevoeding en de vitaminegehalten van een aantal gebruikelijke veevoedermiddelen. Ingegaan wordt op de vraag in hoeverre het vitaminegehalte dat men met chemische of fysische methodes bepaalt, een betrouwbaar gegeven is van wat het dier werkelijk ten goede komt. Het blijkt b.v. dat vitamine A voor een groter percentage geresorbeerd wordt uit een gesolubiliseerde oplossing in water dan uit de gebruikelijke olie-oplossing, en dat de omzetting van provitamine A tot vitamine A sterk afhangt van de gezondheidstoestand van het dier. Het is in dit verband duidelijk dat een biologische ijking van een preparaat betere informatie geeft over de werkelijke waarde voor het dier. Met deze inzichten is rekening gehouden bij de ontwikkeling van nieuwe preparaten als „Duphasol” AD<sub>3</sub> en „Dohyfral” Extra. Ten slotte wordt aandacht besteed aan de verschillende wijzen waarop tekorten aan vitamines in de veevoeding kunnen worden aangevuld.

# Reactieketels in een der fabrieken van N.V. Philips-Duphar



# Beschikbaarheid van organische verbindingen in hogere planten

A. Verloop

Stoffen welke veranderingen in levende organismen teweegbrengen, noemt men biologisch actief. Deze eigenschap van chemische verbindingen wordt in het algemeen door een groot aantal factoren bepaald, zodat het verband met de moleculaire structuur meestal van zeer complexe aard zal zijn.

Bij een poging tot een analyse van deze relatie wordt uitgegaan van een zeer vereenvoudigd model (fig. 1).

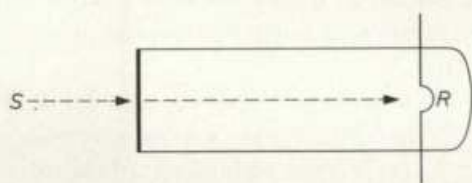


Fig. 1. Schema van de werking van farmaca in een biologisch systeem in het eenvoudigst denkbare geval. Binnen een door een membraan afgesloten geheel bevindt zich een receptor *R*. De werkzaamheid van het farmacon *S* is een functie van de hoeveelheid die de receptor kan bereiken (beschikbaarheid) en van de biologische activiteit per eenheidsconcentratie ter plaatse van de receptor (specifieke biologische activiteit).

Het biologisch systeem wordt hierbij voorgesteld door een door een membraan afgesloten geheel (compartiment), waarbinnen zich een receptor bevindt voor de biologisch actieve stof, het farmacon. Deze receptor is op te vatten als een klein gedeelte van een biologisch macromolecuul (b.v. een enzym) met een zeer bepaalde ruimtelijke structuur, waaraan zich voor het levende object essentiële (biochemische) processen afspelen. Interactie tussen het farmacon en de receptor kan tot een biologisch effect leiden doordat de normaal plaatsvindende processen worden beïnvloed of verhinderd <sup>[1]</sup>.

Ten einde een dergelijke interactie te verkrijgen, is het noodzakelijk dat de stof doordringt tot de receptor; de concentratie van het farmacon ter plaatse van de receptor noemen we de „beschikbaarheid”. Met behulp van het voorgaande zou de biologische activiteit van een stof kunnen worden gedefinieerd als het product van beschikbaarheid en specifieke biologische activiteit. Met de specifieke biologische activiteit wordt dan bedoeld de biologische activiteit van een eenheidsconcentratie ter plaatse van de receptor.

De beschikbaarheid ter plaatse van de receptor wordt door twee groepen van processen beïnvloed.

Ten eerste moet het farmacon door de, het compartiment afsluitende, cellulaire of subcellulaire barrières dringen en zich vervolgens verplaatsen naar de receptor (permeatie en transport). Ten tweede zal het in het biologisch object onderhevig zijn aan allerlei omzettingen, terwijl ook door andere oorzaken, zoals adsorptie en verdamping (uit planten) een deel van de binnengedrongen stof toch soms de receptor niet zal kunnen bereiken.

Bij de realiteit van het zoeken naar biologisch actieve verbindingen heeft men met veel ingewikkelder systemen te maken dan het modelsysteem. Reeds één cel is gecompliceerder dan het modelsysteem. In mens, dier en plant dienen de toe te passen farmaceutica in het algemeen een groot aantal biologische compartimenten met de bijbehorende barrières, transportwegen en metabolische processen te doorlopen voordat ze bij de receptor aankomen. Bij het bestrijden van parasieten zal vaak naast de beschikbaarheid in de gastheer ook de permeatie in de parasiet als extrafactor gaan optreden. In principe echter blijft de voor het model gegeven beschouwing geldig.

Onderzoek naar de beschikbaarheid is van belang voor de ontwikkeling van farmaceutica en heeft als doelstelling het verkrijgen van inzichten in de relaties tussen de moleculaire structuur en/of de fysische eigenschappen van chemische verbindingen enerzijds en de beschikbaarheid in biologische objecten anderzijds. Kennis en toepassing van deze relaties zou van groot belang kunnen zijn voor het vergroten van de trefkans van stoffen die men op biologische activiteit wil onderzoeken, en voor het zo efficiënt mogelijk zoeken naar de optimale verbindingen in stofreeksen waarin biologische activiteit is aangetroffen.

Reeds sinds 1900 is research op het gebied van de beschikbaarheid verricht, in het bijzonder aangaande de celpermeabiliteit <sup>[2]</sup>, doch gedurende de laatste tien jaren is de hoeveelheid werk op dit gebied wel bijzonder sterk toegenomen. Een van de beweegredenen is ongetwijfeld geweest de wens om ter wille van een veilige

Dr. A. Verloop, medewerker van N.V. Philips-Duphar, Research-laboratoria te Weesp.

<sup>[1]</sup> Het begrip receptor is in het begin van deze eeuw geformuleerd door Ehrlich en anderen, en het is gedurende de laatste jaren uitgewerkt door o.a. Ariens en medewerkers, zie b.v. E. J. Ariens, *Molecular pharmacology*, deel I, Academic Press, Londen 1964.

<sup>[2]</sup> Zie b.v. V. Wartiovaara en R. Collander, *Permeabilitätstheorien*, Springer, Wenen 1960.

toepassing van farmaceutica de lotgevallen van deze stoffen in mens, dier en plant zo goed mogelijk te leren kennen. Daarnaast is men zich het belang van nadere inzichten betreffende de beschikbaarheid ten behoeve van de ontwikkeling van nieuwe biologisch actieve verbindingen duidelijker gaan realiseren dan voorheen het geval was <sup>[3]</sup>. Het gehele onderzoek verkeert echter nog in hoofdzaak in een eerste fase, waarin vooral getracht wordt systematisch gegevens te verzamelen over de beschikbaarheid in diverse organismen <sup>[4]</sup>.

Voornamelijk met het doel een illustratie te geven van de aanpak en de problematiek op dit terrein, bespreken we in het volgende een tweetal onderzoekingen verricht aan deelprocessen die van invloed zijn op de beschikbaarheid in *planten*.

### De verschillende processen in planten die van invloed zijn op de beschikbaarheid

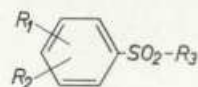
De klassieke bestrijding van plantenziekten hield zich uitsluitend bezig met het doden van de parasieten aan de buitenzijde van de plant (b.v. in de grond of op het blad). Omstreeks 1945 ontstond het idee om naar analogie van de ziektebestrijding bij mens en dier ook te trachten fytofarmaceutica te ontwikkelen die na opname en transport de plant als het ware van binnenuit zouden kunnen beschermen tegen zijn belagers. Hiervoor werd de term *systemische* pesticiden ingevoerd. Dat de bedoelde beschermingswijze in principe mogelijk is, werd voor het eerst aangetoond met organische fosforverbindingen die in Duitsland gedurende de tweede wereldoorlog waren ontwikkeld en die een systemische insecticide werkzaamheid bleken te bezitten <sup>[5]</sup>. Sindsdien zijn diverse andere systemische pesticiden gevonden. Zowel voor dergelijke systemische middelen als voor onkruidbestrijdingsmiddelen is inzicht in hun beschikbaarheid in planten <sup>[6]</sup> van fundamenteel belang.

Bij hogere planten zijn twee belangrijke transportwegen aan te geven, nl. de weg via de bovenaardse delen (bladeren) en de weg via de wortels (en de grond). Wij zullen ons in het volgende tot de tweede mogelijkheid beperken. Via de wortels neemt de plant water op met daarin opgelost anorganische zouten en andere voedingsstoffen. Deze worden door in de stengels aanwezige transportkanalen (het xyleem) verder vervoerd naar het blad. Deze zg. transpiratiestroom wordt voornamelijk in stand gehouden door de zuigkracht der waterverdampende bladeren.

De biologisch actieve stoffen die langs de geschetste weg de plant binnenkomen, dienen hierbij een aantal barrières te nemen. In de eerste plaats treden *adsorptie*- en *absorptieverschijnselen* op. Verbindingen met een apolair karakter worden vaak in sterke mate geabsorbeerd door de humusfractie van de grond en door delen

van de planten welke rijk aan lipiden zijn. Geïoniseerde stoffen met een positieve lading vertonen vaak adsorptie aan grondbestanddelen en delen van planten (b.v. de wanden van het xyleem) welke negatieve groepen bevatten. Ten tweede spelen een belangrijke rol de *permeatieprocessen*: om in het transportsysteem van de plant te komen, dient een verbinding de wortel te kunnen binnendringen, en ook bij de verdere verspreiding b.v. in de bladeren moeten vele (cel)membranen worden gepasseerd. Ten derde zijn vele stoffen onderweg onderhevig aan allerlei *omzettingen*. Hiervan kunnen b.v. worden genoemd microbiologische omzettingen in de grond en enzymatische processen in wortels, stengels en bladeren. Een laatste facet, dat bij dieren vermoedelijk geen belangrijke rol speelt, maar dat bij planten een grote invloed op de beschikbaarheid kan hebben, is de *verdamping* van opgenomen stoffen uit de bladeren.

Elk van de genoemde deelprocessen zal in het algemeen zijn eigen relatie met de moleculaire eigenschappen der desbetreffende verbindingen hebben. Daarom is de kans op het verkrijgen van nadere inzichten het grootst indien het onderzoek op dit gebied zodanig wordt opgezet dat de verschillende barrières welke een molecuul in de verschillende delen van de plant moet overwinnen om van de buitenwereld tot de receptor door te dringen, afzonderlijk kunnen worden bestudeerd; bovendien dienen de invloeden van permeatie en transport enerzijds en stabiliteit anderzijds te worden gescheiden en afzonderlijk gewaardeerd. Als voorbeeld zullen onderzoekingen aangaande de wortelpermeabiliteit en de stabiliteit in de plant worden behandeld, voornamelijk aan de hand van resultaten verkregen met de aromatische sulfonen van het type



waarin  $R_1$  en  $R_2$  willekeurige substituenten zijn, die zich zowel op ortho-, meta-, als para-plaatsen kunnen bevinden, en  $R_3$  een alkylgroep is.

### Wortelpermeatie

#### Methodiek

Het onderzoek naar de wortelpermeatie wordt uitgevoerd met behulp van een proefopstelling waarbij gebruik wordt gemaakt van de bloeding van tomatewortels. De bloeding is een fysiologisch proces, waarbij continu in het xyleem van de wortels water wordt uitgescheiden, dat gemakkelijk kan worden opgevangen (zie fig. 2). De gebruikte tomatewortels zijn afkomstig van planten welke onder gelijke omstandigheden (wat betreft lichtintensiteit, temperatuur en derg.) zijn ge-

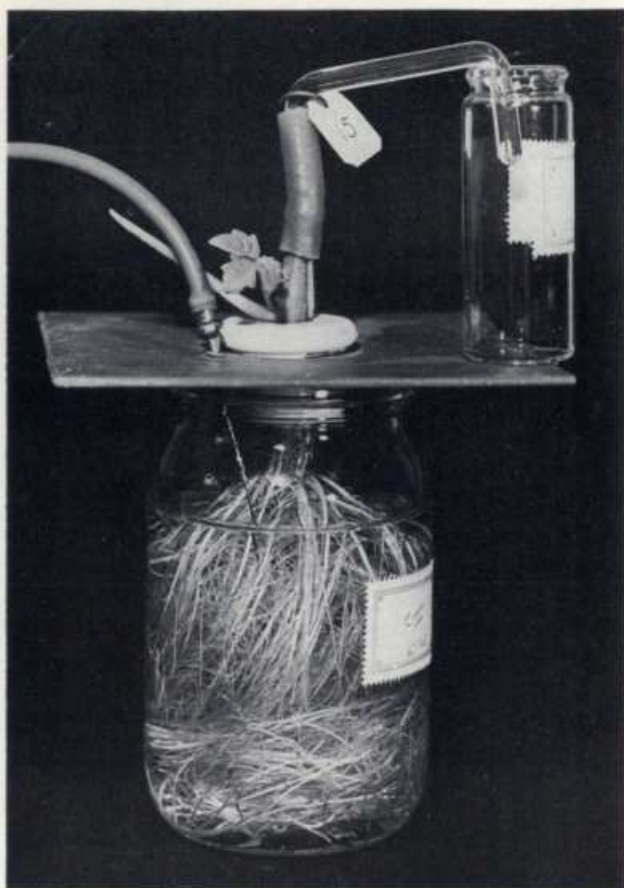


Fig. 2. Proefopstelling voor wortelpermeatie-onderzoek (aan tomatplanten). De van de plant afgesneden wortels nemen continu water met de daarin opgeloste stoffen op, en scheiden dit aan de afgesneden zijde weer af (bloedingssap). Uit het verloop van de concentratie in de buitenoplossing en in het bloedingssap als functie van de tijd worden de stabiliteit en de permeatie van de opgeloste stof in de wortels bepaald.

kweekt; het is nl. gebleken dat dit standaardiseren noodzakelijk is om reproduceerbare proefresultaten te verkrijgen.

De wortels worden geplaatst in een oplossing met een bepaalde concentratie van de te onderzoeken stof, de buitenoplossing. De uit de buitenoplossing opgenomen stof wordt gemetaboliseerd in de wortelweefsels,

waarna de metabolieten weer worden uitgescheiden. Na verloop van enige tijd is — tenzij de stof bijzonder onstabiel is in de wortels — de procentuele omzetting in de buitenoplossing ongeveer gelijk aan die in de wortels.

De stabiliteit van de stof in de wortels wordt bepaald door de concentratie in de buitenoplossing na afloop van de proef te meten (na zes dagen) en deze uit te drukken in procenten van de beginconcentratie, waarbij gecorrigeerd wordt voor de in de wortels binnengedrongen hoeveelheid. De mogelijkheid dat de opgetreden omzettingen andere oorzaken hebben, zoals chemische onstabielheid in oplossing, bacteriële omzettingen en derg., wordt nagegaan doordat tevens controle-oplossingen (zonder wortels) worden onderzocht.

De permeatie wordt vastgesteld door de concentratie van de stof in het bloedingssap te bepalen als functie van de tijd; enige voorbeelden hiervan zijn weergegeven in fig. 3.

#### Aard van het permeatieproces

Volgens de literatuur kan permeatie van stoffen door biologische systemen een *actief* of een *passief* karakter hebben. In het eerste geval heeft het metabolisme een

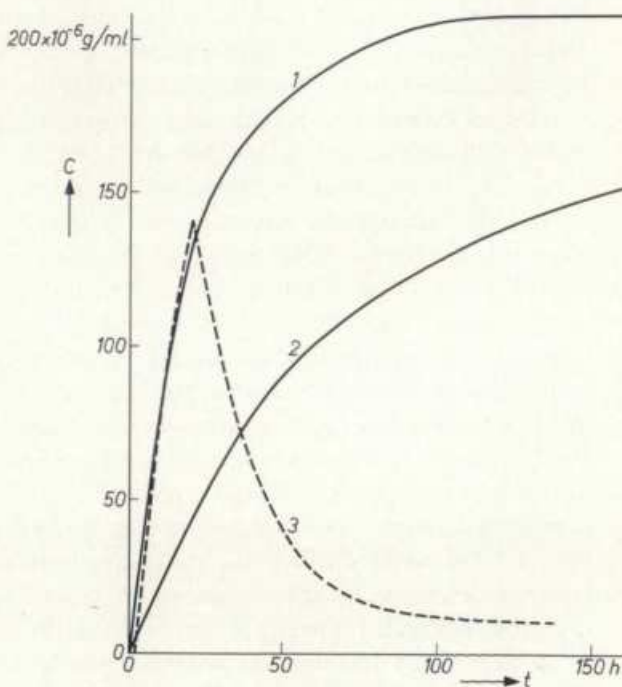


Fig. 3. Enige experimentele gegevens verkregen met de in fig. 2 afgebeelde proefopstelling. De curven 1 en 2 geven het verloop van de concentratie  $C$  van resp. de verbindingen  $\text{H}_2\text{N}-\bigcirc-\text{SO}_2\text{NH}_2$  en  $\text{CH}_3\text{CONH}-\bigcirc-\text{SO}_2\text{NH}_2$  in het bloedingssap van tomatewortels bij een concentratie van de buitenoplossing van  $250 \times 10^{-6} \text{ g/ml}$ . De gestippelde curve 3 geeft het verloop van de concentratie van de eerstgenoemde verbinding waarbij de wortels na 20 uur zijn overgezet in water.

[3] Zie b.v. A. Albert, *Selective toxicity*, Methuen, Londen 1965, en W. A. Sexton, *Chemical constitution and biological activity*, Spon, Londen 1963.

[4] In het bijzonder dient vermeld te worden het belangrijke werk van de researchgroepen van Miller en McCallan en van Brodie, dat verricht is aan de beschikbaarheid in resp. schimmels en dieren, zie b.v. S. E. A. McCallan en L. P. Miller, *Adv. Pest Control Res.* 2, 107, 1958; B. B. Brodie, in: T. B. Binns, *Absorption and distribution of drugs*, Livingstone, Londen 1964.

[5] G. Schrader, *Monographie Nr. 62* zu „Angewandte Chemie“, Verlag Chemie, Weinheim 1952.

[6] Voor wat de systemische pesticiden aangaat, is met „beschikbaarheid in planten“ niet bedoeld de concentratie ter plaatse van de receptor (die zich „in“ de parasiet bevindt), maar de concentratie op de plaats waar de parasiet met het pesticide in aanraking komt.

directe invloed op het permeatiemechanisme. In het tweede geval wordt het passeren van de stof door het biologisch membraan uitsluitend door fysisch-chemische factoren bepaald.

In de literatuur zijn verschillende mechanismen beschreven welke bij actieve permeatie een rol zouden spelen. In vele gevallen wordt daarbij gebruik gemaakt van het begrip van de „carrier”. Dit is een aan de buitenzijde van het membraan voorkomende natuurlijke stof welke specifieke bindingen kan aangaan met een binnen te voeren molecuul; het aldus gevormde complex kan dan volgens sommige concepties passief door het membraan langs een concentratiegradiënt diffunderen, waarna het complex aan de binnenzijde weer gesplitst wordt. Deze splitsing en eventueel ook de biosynthese van de carrier gebeurt onder invloed van het metabolisme van het biologische object.

Rosenberg en Wilbrandt hebben een aantal criteria gegeven waaraan actieve permeatie kan worden herkend [7]. Deze zijn o.a.:

- a) Constante permeatiesnelheid boven een bepaalde verzadigingsconcentratie, in verband met het feit dat dan alle beschikbare carriermoleculen bezet zijn. Bij de wortelpermeatie werd door ons bij een aantal biochemisch stabiele aromatische sulfonen een vrijwel lineair verband gevonden tussen buitenconcentratie en permeatiesnelheid in het concentratiegebied van 0,03-4 mmol/l, zodat hier dus geen verzadigingsverschijnselen optreden.
- b) Remming van het permeatieproces door inhibitoren, welke door verstoring van de energieleverende processen het actieve proces uitschakelen. Met de verbinding p-aminofenylmethylsulfon werd de invloed op de permeatie nagegaan van de inhibitoren NaF,  $\text{NaN}_3$ , 2,4-dinitrofenol en KCN, benevens van de mate van  $\text{O}_2$ -voorziening in het wortelsysteem; hoewel de snelheid van de bloeding (die voor zijn energie ook afhankelijk is van het metabolisme) door deze factoren wel kan worden beïnvloed, werd op de permeatie van het sulfon geen enkel direct effect geconstateerd. Anderzijds kon ook geen directe invloed op de permeatie worden geconstateerd door toevoeging van zouten (b.v.  $\text{KNO}_3$ ) welke de bloeding sterk stimuleren.
- c) Grote structuurspecificiteit, aangezien de binnendringende moleculen moeten „passen” op de carriermoleculen. Circa 150 neutrale organische verbindingen zijn op permeatie door tomatewortels onderzocht. Gekozen zijn verbindingen die in het desbetreffende biologische systeem zo stabiel zijn dat de permeatie redelijk nauwkeurig kon worden bepaald. Hierbij is géén grote structuurspecificiteit aangetroffen; wel is er sprake van een geleidelijke verandering van de permeatie-eigenschappen naar-

mate structuurvariëaties worden aangebracht welke leiden tot verandering van de fysisch-chemische eigenschappen der desbetreffende verbindingen.

- d) Grote temperatuurcoëfficiënt van de permeatieconstante. Ook betreffende dit punt zijn voor de wortelpermeatie geen aanwijzingen verkregen welke op een actief proces wijzen.

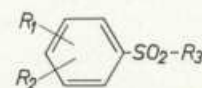
Uit het voorgaande is te concluderen dat de wortelpermeatie van de door ons onderzochte organische verbindingen een passief proces is; dit is in tegenstelling met de wortelpermeatie van anorganische ionen, waarvan het actieve karakter vrij duidelijk is vastgesteld.

In verband met het a-specifieke karakter van passieve permeatie lijkt de veronderstelling gerechtvaardigd dat ook vele andere types organische verbindingen op deze wijze door plantewortels kunnen binnendringen. Dit is een uitermate belangrijk punt, want alleen voor dit type permeatieproces lijkt het mogelijk algemeen geldige regels te vinden.

#### *Verband tussen fysisch-chemische eigenschappen en wortelpermeatie*

Reeds in oude literatuur, omstreeks 1900, is de zg. hydrofiel/lipofiel-balans van een molecuul (HLB) beschreven als een fysisch-chemische grootheid welke de permeabiliteit in plantecellen in belangrijke mate bepaalt. Deze HLB is te beschrijven als de verhouding van de affiniteit van een stof voor een meer polair medium (b.v. water) tot die voor een meer apolair medium (b.v. ether of olijfolie); een maatstaf hiervoor is de verdelingscoëfficiënt tussen b.v. water en ether. Bij de permeatie van stoffen in de cel moeten de celmembranen worden gepasseerd. De waargenomen invloed van de HLB op de permeatie heeft destijds reeds tot de veronderstelling geleid dat de celmembranen veel lipofiele stoffen (i.c. lipiden) moeten bevatten; door analyse der celmembranen werd deze hypothese later bevestigd.

In fig. 4 is voor neutrale aromatische sulfonen van het type



de permeatie in het bloedingssap uitgezet tegen een maatstaf voor de HLB. Het blijkt dat van enig verband geen sprake is. Wanneer echter de resultaten van die verbindingen welke biochemisch niet stabiel zijn, worden weggelaten, dan wordt een (grove) relatie herkenbaar (fig. 5); dit geeft dus een illustratie van de reeds eerder genoemde noodzaak om bij de interpretatie der

[7] Th. Rosenberg en W. Wilbrandt, Int. Rev. Cytology 1, 65, 1952.

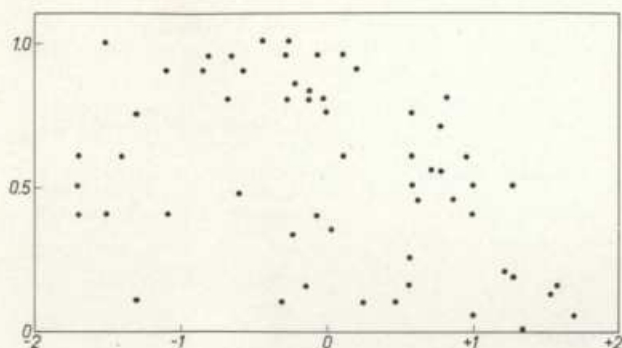


Fig. 4. De permeatie van aromatische sulfonen door tomatewortels. Längs de abscis is uitgezet de logaritme van de verdelingscoëfficiënt tussen een polair en een apolair oplosmiddel; längs de ordinaat is uitgezet de verzadigingsconcentratie in het bloedingsap gedeeld door de concentratie in de buitenoplossing.

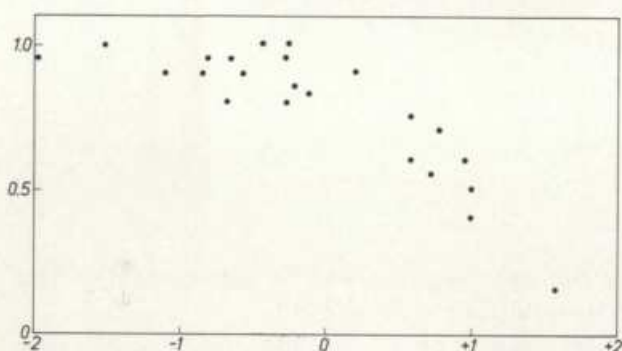


Fig. 5. Als fig. 4, met uitsluiting van de biochemisch niet-stabiele verbindingen.

proefresultaten de invloed van de stabiliteit en van de permeatie te scheiden.

Evenals het geval is met afzonderlijke plantecellen, speelt kennelijk ook bij de veel complexer samengestelde tomatewortelstelsels de HLB der moleculen een essentiële rol bij de permeatie. Bij andere groepen stoffen en voor wortelsystemen van andere planten zijn eveneens relaties tussen de permeatie en HLB-parameters gevonden. Deze resultaten leiden tot de opvatting dat het mogelijk is voor de permeabiliteit van (neutrale) organische verbindingen regels op te stellen welke fysisch-chemisch te formuleren zijn.

### Biochemische stabiliteit in planten

#### Methodiek

We hebben reeds besproken hoe de stabiliteit ten opzichte van plantewortels wordt bepaald. Voor de stabiliteit van een stof in de plant als geheel wordt een andere werkwijze gevolgd, die we aan de hand van experimenten met tuinbonen zullen illustreren. De proefopstelling is afgebeeld in fig. 6. De planten worden met de wortels in een oplossing van de te onderzoeken stof in water geplaatst; onder invloed van de reeds eerder genoemde transpiratiestroom wordt de stof opgenomen. Om vergelijkbare resultaten te verkrijgen, worden alle experimenten uitgevoerd bij dezelfde temperatuur, relatieve luchtvochtigheid en



Fig. 6. Proefopstelling voor de bepaling van de stabiliteit (in tuinboonplanten). Nadat de plant ongeveer de helft van de buitenoplossing heeft opgenomen, worden de wortels, stengels en bladeren geëxtraheerd en geanalyseerd. De stabiliteit van de stof in de plant wordt uitgedrukt als de procentuele verhouding van de in de plant aangetroffen en de door de plant opgenomen hoeveelheid.

lichtintensiteit. Deze proefomstandigheden beïnvloeden nl. de waterverdamping door de bladeren en dus ook de hoeveelheid opgenomen water en stof; ze worden zodanig gekozen dat in de gewenste proeftijd ca. de helft van de buitenoplossing wordt opgenomen, onder welke conditie een kwantitatieve uitvoering der proeven het best realiseerbaar is. Door middel van extractie van wortels, stengels en bladeren en analyse der extracten is het mogelijk de stabiliteit van de onderzochte stof in de plant te bepalen. Deze wordt in het algemeen uitgedrukt als de procentuele verhouding van de in de plant aangetroffen en de door de plant opgenomen hoeveelheid. De bereikte nauwkeurigheid is 5 à 10%.

#### Stabiliteit van basisstructuren en substituenten

Bij het systematische onderzoek binnen een bepaalde klasse van organisch chemische verbindingen worden meestal in het molecuul maar op één plaats tegelijk structuurvariëaties aangebracht. Bij aromatische en heterocyclische verbindingen worden b.v. het ringsysteem en alle substituenten op één na onveranderd gelaten; dit deel van het molecuul zou men de basisstructuur kunnen noemen. Bij sommige types verbindingen vertoont reeds deze basisstructuur een grote onstabieliteit. Zo blijkt b.v. van alle onderzochte stoffen van het type  $R-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CSNH}_2$  (thiobenzamiden) de stabiliteit in de buitenoplossing bij de bloedingsproeven kleiner dan 50% te zijn, terwijl deze in de intacte planten nog geringer is. Uit nader onderzoek is gebleken dat dit wordt veroorzaakt door de grote onstabieliteit van de thio-amidegroep, ook b.v. in nog eenvoudiger moleculen zoals  $\text{CH}_3\text{CSNH}_2$  (methylthioamide).

Bij diverse andere structuurtypes is de basisstructuur stabiel, zodat door onderzoek van gesubstitueerde verbindingen een indruk kan worden verkregen van de stabiliteit der substituenten. Indien omzetting optreedt, moet dan wel de aard der gevormde produkten bekend zijn; het is immers ook mogelijk dat door de activerende invloed van substituenten de basisstructuur zelf onstabiel wordt.

Als voorbeeld zal worden besproken de groep der aromatische sulfonen van het type  $R-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2\text{CH}_3$ . In tabel I is de stabiliteit van een aantal gesubstitueerde verbindingen aangegeven.

Het blijkt dat enkele substituenten in sterke mate omgezet worden, met name:

de  $\text{NO}_2$ -groep, waarbij in eerste instantie reductie tot  $\text{NH}_2$  optreedt;

de  $(\text{HC}=\text{O})$ -groep, waarbij vermoedelijk omzetting tot  $\text{COOH}$  optreedt;

de  $\text{OH}$ -groep, waarvan op grond van analoge voorbeelden uit de literatuur wordt verondersteld dat omzetting in een glycoside plaatsvindt;

**Tabel I.** Invloed van substituenten op de stabiliteit van aromatische sulfonen van het type  $R-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2\text{CH}_3$  in tuinboonplanten (bij een proeftijd van 48 uur).

| Substituent R                                                                     | Stabiliteit in de plant (in %)      |                                        |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------|
|                                                                                   | Concentratie in buitenopl. 2 mmol/l | Concentratie in buitenopl. 0,25 mmol/l |
| H                                                                                 | 95                                  | —                                      |
| $\text{CH}_3$                                                                     | 100                                 | —                                      |
| $\text{OCH}_3$                                                                    | 90                                  | 90                                     |
| Cl                                                                                | 80                                  | 80                                     |
| CN                                                                                | 90                                  | 90                                     |
| $\text{NH}_2$                                                                     | 70                                  | 20                                     |
| $\text{NH}-\text{CH}_3$                                                           | 60                                  | 30                                     |
|  | 70                                  | 65                                     |
| $\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$                                                 | 90                                  | 90                                     |
| $\text{NH}-\text{PO}-\{\text{N}(\text{CH}_3)_2\}_2$                               | 100                                 | 90                                     |
| NH-glucosyl                                                                       | 35                                  | 15                                     |
| OH                                                                                | 20                                  | 10                                     |
| $\text{HC}=\text{O}$                                                              | 0                                   | 0                                      |
| $\text{NO}_2$                                                                     | 0                                   | 0                                      |

de NH-glucosyl-groep, waarbij hydrolyse tot de vrije  $\text{NH}_2$ -verbinding is aangetoond.

Anderzijds is bij diverse andere substituenten, zoals  $\text{CH}_3$ ,  $\text{OCH}_3$ , Cl en CN de stabiliteit in de plant zeer groot.

Een interessant gedrag vertoont de  $\text{NH}_2$ -gesubstitueerde verbinding; het blijkt nl. dat de stabiliteit hier in sterke mate afhankelijk is van de proefconcentratie. Bij substitutie van de  $\text{NH}_2$ -groep is verder in sommige gevallen (*di*-alkylering, acetylering, fosforylering) de stabiliteit weer geheel of grotendeels te herstellen, maar in andere gevallen treedt dit resultaat niet op (*mono*-alkylering, glucosidering).

Ten einde enig inzicht in de achtergrond van deze verschijnselen te verkrijgen, werd daarom een nader onderzoek ingesteld naar het gedrag van de met  $^{35}\text{S}$  gemerkte verbinding  $\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2\text{CH}_3$  in tuinbonen en tomaten. Het is hierbij gebleken dat ca. 10% van de opgenomen stof wordt omgezet in in water oplosbare glucosyl- en acetylderivaten. Een ander deel wordt echter gebonden aan polymere (niet in water oplosbare) bestanddelen van de plant, en de mate waarin dit optreedt is o.a. sterk afhankelijk van de proefconcentratie: bij een concentratie in de buitenoplossing van 2 mmol/l wordt ca. 10% op deze wijze omgezet, maar bij 0,25 mmol/l is dit opgelopen tot ca. 60%. Deze laatste, kwantitatief veel belangrijker, omzetting is dus aansprakelijk voor de concentratieafhankelijkheid van de stabiliteit van de vrije  $\text{NH}_2$ -verbinding; deze invloed van de concentratie is vermoedelijk toe te schrijven aan het aanwezig zijn van een beperkt aantal reactieve

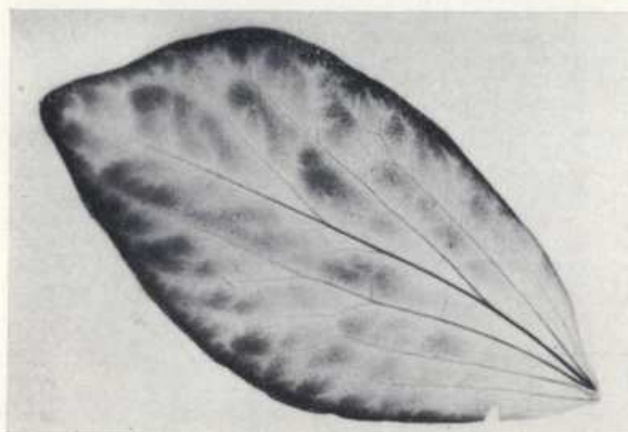
plaatsen aan de plantepolymeren. Op grond van de verkregen gegevens en van modelproeven wordt verondersteld dat ook bij de polymeerbinding twee reactietypes optreden, nl. de vorming van enerzijds een glycosidische en anderzijds een acylbinding (vgl. fig. 8).

Wanneer de behandelde planten met kokend water worden geëxtraheerd, dan worden de vrije  $\text{NH}_2$ -verbinding en de glucosyl- en acetylderivaten kwantitatief geëxtraheerd; hetzelfde geldt voor de glycosidisch aan de plantepolymeren gebonden stof, omdat onder deze omstandigheden een kwantitatieve hydrolyse van deze binding optreedt. Het p-aminofenylmethylsulfon dat via een acylbinding van het type  $\text{RNHCO}$ -polymeer is gebonden, kan echter pas worden geïsoleerd na ex-

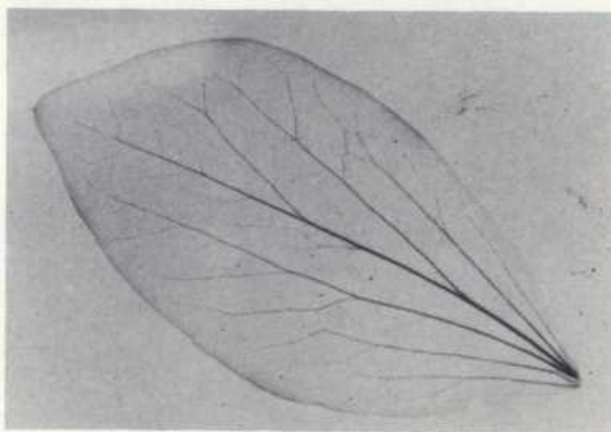
bepaald. In fig. 8 is een samenvatting van de verkregen resultaten gegeven.

De vraag doet zich voor of dergelijke met behulp van een bepaalde basisstructuur gevonden stabiliteiten van substituenten ook een meer algemene geldigheid bezitten.

In de organische chemie is het een bekend verschijnsel dat de reactiviteit van een bepaalde groep beïnvloed wordt door de rest van het molecuul; a priori zou men iets dergelijks ook verwachten met betrekking tot de reactiviteit van substituenten ten opzichte van enzym-systemen. Uit onderzoek met behulp van andere stabiele basisstructuren is gebleken dat dit inderdaad het geval is; door beïnvloeding van de elektronenverdeling



a



b

Fig. 7. Autoradiogrammen, verkregen van een blad van een tuinboonplant die de verbinding  $\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2\text{CH}_3$ , gemerkt met het radioactieve isotoop  $^{35}\text{S}$ , heeft opgenomen. a) Autoradiogram opgenomen vóór en b) na extractie met kokend water. Door deze extractie worden al de radioactieve verbindingen verwijderd behalve die welke met een zg. acylbinding gebonden waren aan polymere bestanddelen van de plant. Op deze wijze kon deze binding gelokaliseerd worden: deze blijkt zich te bevinden in de buurt van of aan de wanden van de xyleemvaten van het blad.

tractie met behulp van 0,5 mol/l HCl bij 100 °C. Op grond hiervan is het op een elegante wijze mogelijk om uit te maken waar deze laatste binding ongeveer in de plant is gelokaliseerd, door van de bladeren vóór en ná de extractie met kokend water autoradiogrammen te maken. Uit de in de fig. 7a en b gereproduceerde resultaten blijkt dat deze binding aan of vlak bij de wanden der xyleemvaten plaatsvindt.

Met behulp van het op deze wijze verkregen inzicht is dan ook het effect van de diverse N-substituties gemakkelijk te verklaren. Di-alkylering neemt nl. de mogelijkheid voor de aangegeven reactie weg en mono-alkylering doet dit niet; acetylering, fosforylering en glucosidering beschermen eveneens de  $\text{NH}_2$ -groep, maar het glucoside is in de planten niet stabiel.

In alle onderzochte gevallen blijkt de basisstructuur  $\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2\text{CH}_3$  niet te worden aangetast, zodat in dit geval inderdaad de stabiliteit van de para-substituenten is

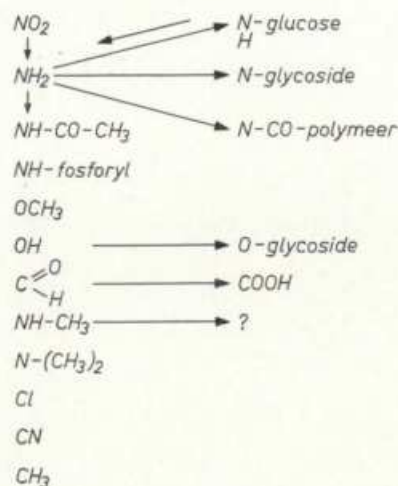


Fig. 8. Overzicht van de mogelijke omzettingen (in tuinboonplanten) van de substituenten R bij de verbindingen  $\text{R}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2\text{CH}_3$ . Indien achter een substituent niets is vermeld, is deze stabiel.

en/of door ruimtelijke afscherming van de substituent verandert de substraat-enzyminteractie en/of de reactiviteit van het substraat in het substraat-enzym-complex.

Daarnaast blijkt er echter met betrekking tot de stabiliteit van een substituent nog een tweede verschijnsel op te treden, waarvan een voorbeeld is gegeven in *tabel II*. Terwijl hier de beide genoemde invloeden op de CH<sub>3</sub>O-groep vrijwel gelijk zijn, blijkt de stabiliteit toch zeer sterk te verschillen. Er is echter een groot verschil in de HLB van de beide moleculen, dat wordt geïllustreerd door de in de tabel vermelde verdelingscoëfficiënten. Waarschijnlijk is deze invloed op de

stabiliteit van substituenten toe te schrijven aan subcellulaire *lokalisatie* van de, de desbetreffende omzettingen veroorzakende, enzymen in een lipiderijk milieu.

Uit verder onderzoek zal moeten blijken of zodanige inzichten in de invloed der genoemde factoren zijn te verkrijgen dat ook prognoses over de stabiliteit van substituenten in potentiële fytofarmaceutica mogelijk zullen worden.

**Tabel II.** Invloed van de hydrofiel/lipofiel-balans (HLB) van het totale molecuul op de biochemische omzetting van de CH<sub>3</sub>O-groep in een hydroxylgroep.

| Verbinding                                                                                                                                          | Verdelingscoëfficiënt water/ether | Stabiliteit in tuinbonen na 14 dagen (in %) |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------|
| CH <sub>3</sub> O-  -SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>               | 0,27                              | 90                                          |
| CH <sub>3</sub> O-  -SO <sub>2</sub> C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> | 0,02                              | 10                                          |

**Samenvatting.** De beschikbaarheid van organische stoffen in biologische objecten wordt gedefinieerd en besproken als een van de factoren welke de biologische werking van een (fyto-) farmacon bepalen. De betekenis en de wijze van uitvoering van beschikbaarheidsonderzoek worden nader beschouwd, voornamelijk met behulp van planten als biologisch object. Ter illustratie van de aanpak en de problematiek op dit terrein worden enige deelprocessen welke de beschikbaarheid in planten beïnvloeden, nl. de wortelpermeatie en de biochemische omzetting, nader besproken met behulp van experimentele resultaten verkregen met aromatische sulfonen. Nader wordt ingegaan op de aard van het wortelpermeatieproces en op het gevonden verband met fysisch-chemische eigenschappen van de onderzochte verbindingen. Geconcludeerd wordt dat het opstellen van algemene regels voor dit proces mogelijk lijkt. De invloed van de biochemische stabiliteit wordt toegelicht met behulp van een onderzoek over de stabiliteit van een aantal substituenten in fenylmethylsulfon. Het blijkt dat deze stabiliteit van substituenten niet noodzakelijk dezelfde waarde heeft in andere structuurtypes, omdat ze wordt beïnvloed door de rest van het molecuul.

# Fenolsynthese en fotomorfogenese

G. Engelsma

## Fenomenologie van de fotomorfogenese

Voor de jonge kiemplant, die zich veelal bevindt tussen andere planten die al een zekere voorsprong hebben, is, wanneer hij niet behoort tot de kleine groep van op ander leven parasiterende soorten, de strijd om het bestaan in de eerste plaats een strijd om een plaats onder de zon. De zon verschaft hem de energie verder te leven nadat de in het zaad meegekregen voorraadstoffen zijn verbruikt. Ook bij zijn verdere ontwikkeling blijft de belichtingssituatie essentieel, en vooral hierbij past de plant zich aan.

De wijze waarop dit geschiedt, hangt af van de aard van de plant. Dit blijkt bij voorbeeld bij de zaadkieming: sommige zaden kiemen pas wanneer ze korte tijd zijn belicht, bij andere daarentegen remt belichting juist de kieming. Zo ook bij de bloei: er zijn planten die pas gaan bloeien wanneer ze langer dan een bepaald aantal uren achtereen per dag belicht worden (langedagplanten), bij andere mag de aaneengesloten lichtperiode per dag een bepaalde waarde niet overschrijden, willen ze tot bloei geraken (kortedagplanten). Het is uit een teleologisch oogpunt aannemelijk dat deze aanpassingsmechanismen de bestaans- en voortplantingskansen van een plant vergroten.

Om een aantal aspecten van de invloed van licht op de ontwikkeling van de plant — fotomorfogenese — toe te lichten, hebben we de kiemplant van de augurk gekozen, een plant waaraan in het Philipslaboratorium te Eindhoven gedurende een aantal jaren onderzoeken zijn verricht <sup>[1]</sup>. Fig. 1 laat twee even oude kiemplantjes zien, 5 dagen na het uitzaaïen. Het rechtse is opgegroeid in het donker, het linkse heeft 12 uur per dag licht gehad. Het in het donker gekweekte plantje maakt een kleurloze indruk: de voor de fotosynthese nodige groene kleurstof, chlorofyl, heeft zich niet gevormd. De stengel, het hypocotyl, is zeer lang geworden en is nauwelijks nog in staat de cotylen, de oorspronkelijke zaadlobben, te dragen. Deze laatste zijn sinds de kieming maar weinig in omvang toegenomen. Vergelijken we hiermee de belichte zaailing, dan zien we dat het hypocotyl veel korter en ook aanzienlijk steviger is. De aanvankelijke kromming in het deel van het hypocotyl dat grenst aan de cotylen, de plumulaire haak, heeft zich geopend, en de cotylen,



Fig. 1. 5 dagen oude augurkekiemplanten. Rechts: opgegroeid in het donker. Links: 12 uur per etmaal belicht.

die groen geworden zijn, zijn bezig uit te groeien tot organen met een bladfunctie. Behalve deze met het blote oog waarneembare verschillen kunnen we met bijzondere hulpmiddelen ook inwendige veranderingen constateren die een gevolg zijn van de belichting, zoals een versnelde afbraak van de in de cellen van de cotylen aanwezige voorraadstoffen, een verhoging van het ascorbinezuurgehalte en een versnelde ophoping van fenolische verbindingen zowel in de cotylen als in het hypocotyl.

Krijgt de eerste plant geen licht, dan sterft hij na ongeveer 9 dagen af, nog voordat alle voorraadstoffen zijn verbruikt. De tweede plant daarentegen heeft onder invloed van licht een fotosynthese-apparaat opgebouwd, dat in staat is lichtenergie om te zetten in chemische energie <sup>[2]</sup>. Deze wordt onder meer gebruikt om uit koolzuur uit de lucht en uit stikstofverbindingen uit de grond de bouwstenen te produceren voor de verdere groei.

Dr. G. Engelsma, medewerker van Philips' Natuurkundig Laboratorium, Eindhoven.

<sup>[1]</sup> G. Meijer, *Acta bot. neerl.* 6, 395, 1957; 7, 614, 1958; 7, 621, 1958; 8, 189, 1959.

G. Meijer, *The spectral dependence of flowering and elongation*, dissertatie Utrecht, 1959.

G. Meijer en G. Engelsma, *Photochem. Photobiol.* 4, 251, 1965.

<sup>[2]</sup> J. S. C. Wessels en M. van Koten-Hertogs, *Fotosynthese*, *Philips techn. T.* 27, 245-262, 1965/66 (no. 10).

Hier kunnen we er meteen op wijzen dat een duidelijk onderscheid dient te worden gemaakt tussen deze fotosynthese en de fotomorfogenese, dus tussen de energieverschaffende en de formatieve werking van licht, welke laatste veelal gerealiseerd wordt met veel geringere hoeveelheden licht en waarbij, zoals we later zullen zien, andere pigmenten betrokken zijn.

Voor elke plantesoort verloopt de ontwikkeling van kiemend zaad tot vruchtdragende plant volgens een voor die soort karakteristiek patroon, dat genetisch is vastgelegd. Een aanpassing aan de omgeving wordt verkregen doordat de factoren die deze omgeving bepalen, in het bijzonder licht, een invloed kunnen doen gelden op bepaalde fasen van het ontwikkelingspatroon.

Fenomenologisch kunnen we de ontwikkeling van de plant splitsen in een aantal afzonderlijke verschijnselen als zaadkieming, wortelvorming, lengtegroei van de stengel, opening van de plumulaire haak, ontwikkeling van blad en van bloem, verschijnselen die zich tot op zekere hoogte als op zichzelf staande fenomenen laten bestuderen; maar aan de andere kant is het a priori reeds in te zien dat deze niet los zijn te denken van het geheel van de opgroeiende plant. Ze zijn juist zodanig op elkaar afgestemd dat de plant zich ontplooit tot een harmonisch functionerende eenheid.

In dit artikel zullen we ons in het bijzonder bezighouden met twee verschijnselen, die ongeveer gelijktijdig optreden wanneer in het donker gekweekte augurkezaailingen aan het licht worden blootgesteld: de remming van de lengtegroei van het hypocotyl en de versnelde ophoping van fenolen (hydroxykaneelzuren), verschijnselen die we zowel in hun onderlinge relatie als tegen de achtergrond van fotomorfogenese in het algemeen nader zullen beschouwen.

Wat de praktische perspectieven van het onderzoek aangaat: uit het bovenstaande volgt dat het mogelijk is via de factoren die het milieu vormen, in het bijzonder de belichting, de ontwikkeling van de plant in een bepaalde richting te leiden. Dit is het uitgangspunt geweest van het in dit laboratorium opgezette onderzoek met betrekking tot licht en plantegroei [1]. Hiervoor bestaan belangrijke toepassingsgebieden, waarbij men echter wel voornamelijk beperkt blijft tot kascultures. In de loop der jaren heeft zich daarnaast belangstelling ontwikkeld voor beïnvloeding langs chemische weg, hetgeen ook bij de teelt in het open veld toepassing zou kunnen vinden. Hier komen we op een terrein dat grenst aan dat van de onkruidbestrijding, waaraan bij de N.V. Philips-Duphar onderzoek wordt verricht. Voor beide gebieden is het van groot belang een inzicht te hebben in de reguleringsmechanismen die aan de ontwikkeling van de plant ten grondslag liggen. Een van de manieren om dit te verkrijgen, is na te gaan hoe de

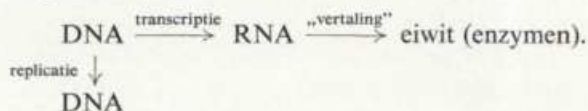
plant een bepaalde invloed van buiten verwerkt, waarbij licht een zeer geschikt, niet beschadigend, middel is.

### De moleculaire basis van de fotomorfogenese

Zoals bekend, is een plant opgebouwd uit een groot aantal cellen, die zich op grond van structuur en functie laten indelen in verschillende celtypen. In het algemeen bestaat een cel van buiten naar binnen uit 1) een celwand, die wordt opgebouwd vanuit de celinhoud, 2) protoplasma, waarin zich vrijwel alle essentiële processen voor de instandhouding en het functioneren van de cel afspelen, en 3) een of meer vacuoles, die door een membraan van het protoplasma zijn gescheiden en waar in waterige oplossing organische en anorganische verbindingen zijn opgeslagen. In het protoplasma bevinden zich verschillende gestructureerde eenheden, de celorganellen, elk met hun eigen functie, zoals de kern (het informatiecentrum van de cel), de mitochondriën en de chloroplasten, die zorgen voor de energievoorziening van de cel, de plastiden, waarin voorraadstoffen worden opgeslagen, en de ribosomen, waar de enzym synthese plaatsvindt.

Enzymen spelen bij de opbouw van de cel en bij het functioneren ervan een belangrijke rol. Zij controleren zowel de chemische reacties die de bouwstenen leveren voor de structuur van de cel en van zijn organellen, als de reacties die in en rond deze organellen plaatsvinden.

Daar, zoals zal blijken, de *synthese* van enzymen een belangrijk punt is bij de fotomorfogenese, is het nodig hier iets dieper op in te gaan. Het mechanisme dat ten grondslag ligt aan de zg. enzym synthese *de novo*, d.i. de synthese van enzymen uit hun basiselementen, de aminozuren, kan men zich in gesimplificeerde vorm als volgt voorstellen:



Dit beeld berust hoofdzakelijk op onderzoek aan bacteriën en bacteriofagen, maar er is goede grond om aan te nemen dat dit mechanisme bij de hogere plant in grote lijnen analoog is. De genetische informatie voor de plant is vastgelegd in de kern van elke cel, en wel in de vorm van zeer lange polymere moleculen, het DNA (deoxyribonucleic acid), waarvan de vier essentiële bouwstenen een code vormen die onder meer de samenstelling van de enzymen bepaalt. De rol van dit DNA is tweeledig: het kan zich repliceren tot een nauwkeurige kopie van zichzelf, die het informatiecentrum van een nieuwe cel kan worden, en het is in staat door transcriptie gedeelten van zijn informatie in de vorm van een nieuwe code, die precies op de oorspronkelijke past, over te dragen op het RNA (ribonucleic acid), een

polymeer van analoge samenstelling. Een gedeelte van dit RNA kan nu als matrix dienen waarop de aminozuren zich in een bepaalde volgorde aanhechten om tot een polypeptideketen van een enzymmolecuul aaneengeregen te worden („vertaling”). Dit laatste proces speelt zich af aan de ribosomen.

In het begin is reeds vermeld dat de cellen waaruit de plant is opgebouwd, verschillen in structuur en functie vertonen. Deze verschillen laten zich herleiden tot verschillen in het enzympatroon van de gespecialiseerde cel. Onder andere uit proeven met weefselcultures, waarbij is gebleken dat uit één enkele cel zich een hele plant laat ontwikkelen, moet de conclusie worden getrokken dat elke cel de genetische informatie voor de gehele plant bezit, dus ook voor alle enzymen die we in de plant aantreffen. Omdat de gespecialiseerde cel slechts over een deel van deze enzymen beschikt, moeten we aannemen dat hij slechts gedeeltelijk gebruik maakt van deze informatie. Bepaalde genen zijn geblokkeerd, of met andere woorden, slechts een gedeelte van het DNA is in staat zijn code te laten omzetten tot enzymen. Onder invloed van bepaalde verbindingen, aangeduid als inductoren en repressoren, kan deblokkering, respectievelijk blokkering van bepaalde gedeelten van het DNA plaatsvinden, waardoor dus verschuivingen in het enzympatroon ontstaan. Omtrent het mechanisme waardoor dit gerealiseerd wordt, tast men nog vrijwel geheel in het duister. In sommige gevallen is gevonden dat het toedienen van een bepaalde verbinding leidt tot inductie of repressie van een of meer enzymen die nauw betrokken zijn bij de afbraak of aanmaak van deze verbinding, hetgeen dus duidt op een reguleringsmechanisme waarmee het levende organisme zich aanpast aan het veranderde aanbod van een bepaalde metabooliet. Ook zijn er aanwijzingen dat sommige hormonen, verbindingen die zoals bekend een coördinatie tot stand brengen tussen de verschillende organen van een levend organisme, hun werking uitoefenen via enzyminductie.

Bovenstaand mechanisme bepaalt dus welke enzymen er gemaakt worden en hoeveel er van een bepaald enzym gemaakt wordt. Daarnaast onderscheiden we nog een reguleringsmechanisme waarbij door middel van speciale verbindingen, aangeduid als cofactoren en inhibitoren, de *snelheid* waarmee een enzym werkt, resp. verhoogd of verlaagd wordt.

Het blijkt dat bij de formatieve invloed van licht op de plant beide reguleringsmechanismen een rol spelen. Aan de hand van wat er bekend is omtrent de fenolsynthese en de remming van de lengtegroei bij de augurkekiemplant, zullen we trachten dit toe te lichten.

### De door licht gestimuleerde fenolsynthese

In het hypocotyl van de augurk worden twee hydroxykaneelzuren gesynthetiseerd, p-cumaarzuur en ferulazuur<sup>[3]</sup>, verbindingen met een fenolisch karakter, d.w.z. gekenmerkt door de aanwezigheid van de fenolgroep  $\text{C}_6\text{H}_5\text{-OH}$ . Aangezien beide fenolen niet, of althans niet snel, worden omgezet in andere verbindingen, kunnen we de snelheid van de fenolsynthese afmeten aan de snelheid waarmee de fenolen zich ophopen.

Zolang de plant nog niet aan licht blootgesteld geweest is, bevat zij nog maar weinig van deze fenolen. Ze zijn voornamelijk geconcentreerd in het bovenste (apicale) deel van het hypocotyl. Na de overgang van donker naar licht duurt het ongeveer twee uur voordat de fenolsynthese meetbaar sneller wordt (fig. 2). Wan-

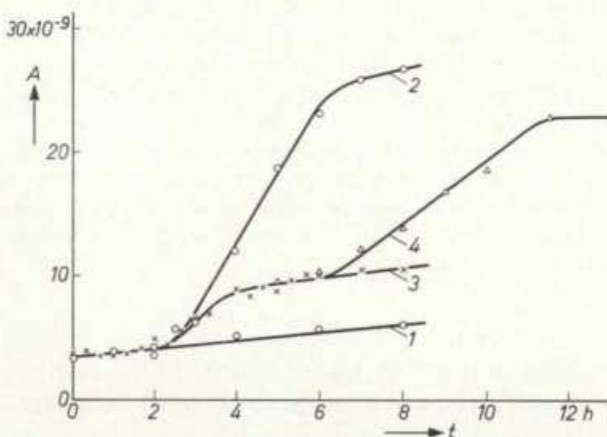


Fig. 2. De hoeveelheid *A* hydroxykaneelzuren per hypocotyl bij drie dagen oude, in het donker opgekweekte augurkekiemplanten als functie van de tijd. De vier krommen slaan op planten die na de genoemde drie dagen (1) onbelicht bleven, (2) ononderbroken werden belicht, (3) één uur werden belicht en daarna teruggingen naar het donker, (4) één uur werden belicht, dan drie uur in het donker verbleven, en vervolgens ononderbroken werden belicht. De hoeveelheid hydroxykaneelzuren is in mol opgegeven. Belichting: blauw licht (400-500 nm), 600  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ .

neer onafgebroken belicht wordt, bereikt na ruim zes uur de hoeveelheid hydroxykaneelzuren per hypocotyl een niveau dat — onafhankelijk van het feit of de belichting al dan niet wordt voortgezet — gedurende de eerstvolgende 40 uur niet sterk meer verandert (curve 2). Wordt kortere tijd belicht, b.v. slechts één uur, dan neemt de snelheid waarmee de hydroxykaneelzuren zich ophopen eerder af en komt de totale hoeveelheid per hypocotyl op een lager niveau (curve 3). De aldus belichte planten hebben evenwel de capaciteit behouden om meer hydroxykaneelzuren te synthetiseren — ongeveer tot aan het niveau dat bij onafgebroken belichting bereikt wordt —, hetgeen blijkt wanneer ze opnieuw in het licht worden gezet (curve 4).

[3] G. Engelsma en G. Meijer, *Acta bot. neerl.* **14**, 54 en 73, 1965.

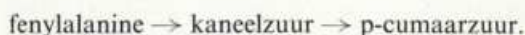
De stimulering door licht is altijd het grootst in het apicale deel van het hypocotyl; het begint met een verhoogde synthese van p-cumaarzuur, later wordt ook meer ferulazuur gemaakt. Steeds wordt gevonden dat de verhouding ferulazuur tot p-cumaarzuur groter is in het basale (onderste) deel dan in het apicale deel van het hypocotyl. Op het mogelijke belang van de onderlinge verhouding van deze fenolen voor de lengtegroei zullen we later nader ingaan.

Hydroxykaneelzuren komen voor in vele hogere planten. Ze zijn als regel aanwezig als suikerderivaten, zo ook bij de augurk. Deze verbindingen, of de overeenkomstige alcoholen, vormen de bouwstenen van de houtstof lignine, een polymeer produkt dat vooral dient ter versteviging van de vaatbundels, maar dat zich bij houtachtige gewassen ook afzet in en op de wanden van andere cellen van stam of stengel. Behalve een functie bij de lengtegroei is ook bij zaadkieming, knopvorming, bladontwikkeling en bloei, voor fenolen een regulerende rol gepostuleerd.

Chemisch verwant zijn twee groepen plantepigmenten, de flavonoiden en anthocyanen, verbindingen die zich eveneens vaak sterk ophopen gedurende een betrekkelijk korte periode volgend op het moment waarop een kiemplant voor het eerst aan licht wordt blootgesteld [4]. Het precieze nut hiervan voor de plant is nog niet duidelijk. Mogelijk dat deze aromatische, sterk in het UV absorberende verbindingen vitale bestanddelen van de celinhoud zoals nucleïnezuren en enzymen beschermen tegen beschadiging door straling.

Algemeen wordt aangenomen dat de hydroxykaneelzuren in de plant worden gesynthetiseerd uit suikers op de wijze die in fig. 3 vereenvoudigd is weergegeven (de shikimizuursyntheseweg). Van de hierbij gepostu-

leerde intermediären blijken bij de augurkekiemplant alleen L-fenylalanine en kaneelzuur de synthese van hydroxykaneelzuren, in dit geval voornamelijk p-cumaarzuur, te stimuleren. We nemen op grond van deze gegevens aan dat het p-cumaarzuur wordt gesynthetiseerd uit fenylalanine, dat aanvankelijk in het zaad was opgeslagen, met als tussenstap de vorming van kaneelzuur:



In principe zal de stimulering van de synthese van p-cumaarzuur door licht kunnen berusten op een verhoogd aanbod van fenylalanine of op een beïnvloeding van de bij de omzetting van deze verbinding betrokken enzymen. Alleen de laatste mogelijkheid hebben we tot nu toe onderzocht.

De eerste stap, de deaminering van fenylalanine, verloopt onder invloed van het enzym fenylalanine-deaminase [5], dat vrij stabiel is, zodat het mogelijk is *in vitro* de enzymconcentratie als functie van de belichting kwantitatief te bepalen (fig. 4a) [6]. Worden in het donker gekweekte kiemplanten ononderbroken belicht, dan begint na ongeveer 90 min de enzymconcentratie toe te nemen (curve 2). Na drie uur bereikt deze concentratie een maximum om dan weer langzaam af te nemen. Ook wanneer slechts één uur wordt belicht, bereikt de enzymconcentratie zijn maximum na ongeveer dezelfde periode van drie uur (curve 3). Het maximum ligt in dit geval lager en bovendien is de afnemingsnelheid sneller. Wordt opnieuw belicht, dan begint de enzymconcentratie na 60 à 90 min. weer toe te nemen (curve 4.)

In fig. 4b is voor dezelfde drie verschillende belich-

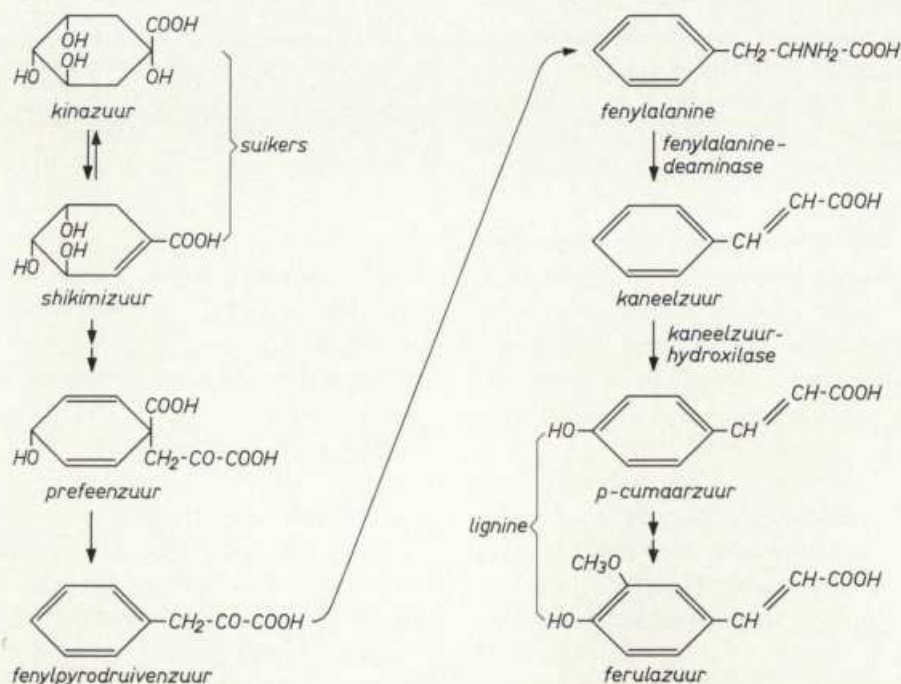


Fig. 3. Syntheseweg van de hydroxykaneelzuren.

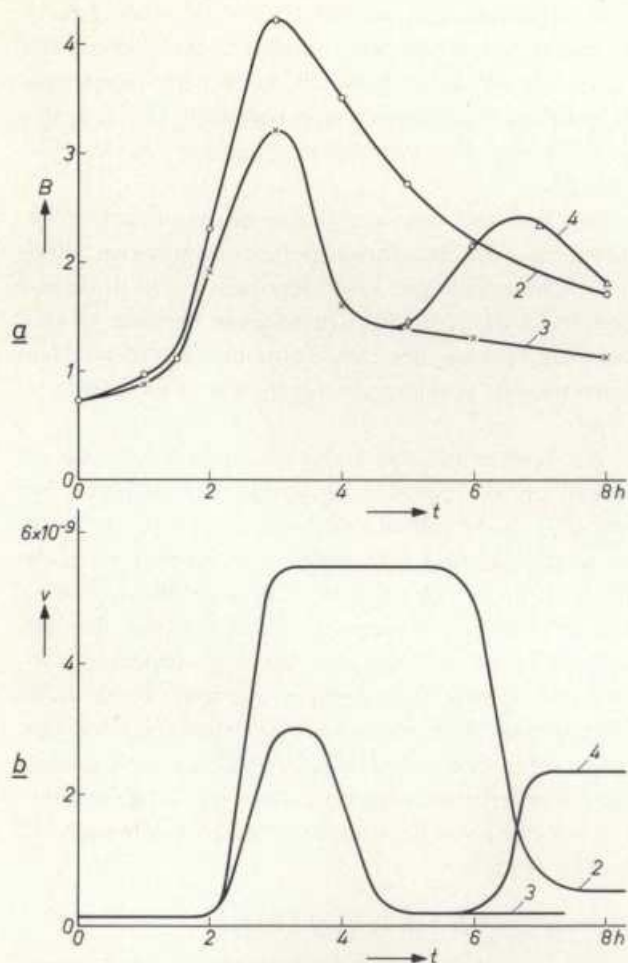


Fig. 4. a) De hoeveelheid  $B$  (in activiteitsenheden, zie [6]) van het enzym fenylalaninedeaminase per hypocotyl bij drie dagen oude, in het donker gekweekte augurkekiemplanten die dezelfde lichtbehandelingen hebben ondergaan als vermeld bij fig. 2. b) De snelheid  $v$  (in mol per uur) waarmee de hydroxykaneelzuren zich ophopen in het hypocotyl van deze planten, zoals afgeleid uit de in fig. 2 weergegeven curven.

tingsprogramma's — doorlopende belichting; één uur belichting, daarna donker; en één uur belichting, drie uur donker, gevolgd door ononderbroken belichting — als functie van de belichtingsduur uitgezet de snelheid van de fenolsynthese (d.i. de eerste afgeleide van de curven in fig. 2). Vergelijking van fig. 4a en b toont een verrassende correlatie: een verhoogde synthese van hydroxykaneelzuren wordt steeds voorafgegaan door een toeneming in enzymconcentratie en zij bereikt een maximum ongeveer op het tijdstip waarop de enzymconcentratie haar maximale hoogte bereikt. De afnemende van de hoeveelheid enzym wordt na enige tijd — de duur hiervan wordt vermoedelijk bepaald door de hoeveelheid intermediären (kaneelzuur) die zich tijdelijk heeft opgehoopt — gevolgd door een afnemende van de snelheid van de fenolsynthese. Hoe de snelle afnemende van de hoeveelheid fenylalaninedeaminase tot stand komt, die vooral tot uitdrukking komt

wanneer slechts korte tijd is belicht, is nog een punt van nader onderzoek.

Het karakter van het reguleringssysteem is, zoals we aan de figuur kunnen zien, zodanig dat de plant die door belichting ertoe gebracht is de synthese van hydroxykaneelzuren te versnellen, hiermee niet blijft doorgaan. Zou dit wel het geval zijn, dan zou dit voor het metabolisme als geheel zeer onaangename gevolgen hebben. Een opvallend aspect van het reguleringssysteem is ook dat de hoeveelheid enzym die door belichting wordt geïnduceerd, afhangt van een eventuele voorafgaande belichting (zie curve 4 in fig. 4a). Als de voorafgaande belichting maar voldoende lang heeft geduurd — bij de hier gebruikte lichtintensiteit ongeveer 8 uur —, dan lukt het zelfs helemaal niet meer om de enzymconcentratie opnieuw te verhogen. De plant beschikt kennelijk over een mechanisme dat een bepaalde grens stelt aan de hoeveelheid te induceren enzym [7].

De volgende stap in de synthesesweg van p-cumaarzuur, de hydroxylering van kaneelzuur, is moeilijker te bestuderen, omdat het enzym dat deze reactie katalyseert, kaneelzuurhydroxylase [8], *in vitro* zeer instabiel is, en het enzym zich derhalve niet laat isoleren. Aangezien we dus niet in staat zijn de enzymconcentratie *in vitro* te bepalen, zijn we aangewezen op bepalingen *in vivo*, waarbij de activiteit van het enzym wordt afgeleid uit de hoeveelheid kaneelzuur die in een segment van het hypocotyl onder standaardcondities wordt omgezet tot p-cumaarzuur [9]. Uit deze experimenten blijkt dat de kaneelzuurhydroxylase-activiteit een soortgelijke afhankelijkheid vertoont van de belichtingscondities als de fenylalaninedeaminase-activiteit.

Het vermoeden bestaat dat naast regulering van het enzymniveau ook regulering van de snelheid van de enzymwerking door middel van cofactoren en inhibitoren een rol speelt. Men heeft gevonden dat beide enzymen voor hun functioneren geheel of gedeeltelijk afhankelijk zijn van cofactoren; fenylalaninedeaminase van glutathion, kaneelzuurhydroxylase vermoedelijk van bepaalde pteridinderivaten. In beide gevallen betreft het gereduceerde verbindingen en het is bekend dat de concentratie in de plant van sommige van deze

[4] H. W. Siegelman, in: *Biochemistry of phenolic compounds* (red. J. B. Harborne), Academic Press, Londen 1964, blz. 437.

[5] J. Koukol en E. E. Conn, *J. biol. Chem.* **236**, 2692, 1961.

[6] G. Engelsma, *ter perse*.

[7] Voor een soortgelijk onderzoek uitgevoerd met aardappelschijfjes, waarbij eveneens een correlatie werd gevonden tussen de inductie van het enzym fenylalaninedeaminase en de synthese van fenolen, zie M. Zucker, *Plant Physiol.* **40**, 779, 1965.

[8] P. M. Nair en L. C. Vining, *Phytochem.* **4**, 161, 1965.

[9] G. Engelsma, *Acta bot. neerl.* **15**, 394, 1966 (no. 2); *Nature* **208**, 1117, 1965.

verbindingen eveneens toeneemt in het licht [10].

Op welke wijze de cofactoren en inhibitoren hun werking zouden verrichten, is bij de fenolsynthese nog onvolledig onderzocht. Een nadere toelichting van dit type reguleringsmechanisme zullen we geven bij de bespreking van de remming van de lengtegroei.

Over de regulering via de enzymsynthese kan nog worden opgemerkt dat deze laatste inderdaad tot stand komt op de in het vorige hoofdstuk geschetste manier, dus uit de basiselementen op een RNA-matrix, die op haar beurt op een DNA-matrix wordt gevormd (enzymsynthese *de novo*), en dat ze b.v. niet het resultaat is van veranderingen in reeds bestaande eiwitmoleculen. Dit is aangetoond met behulp van een tweetal verbindingen die het mechanisme voor de eiwitsynthese blokkeren, nl. actinomycine D, dat de transcriptie van DNA in RNA verhindert, en cycloheximide, dat de vertaling van RNA tot eiwit blokkeert. Beide verbindingen remmen de stimulering die licht uitoefent op de omzetting van fenylalanine en kaneelzuur tot p-cumaarzuur in hypocotylsegmenten. Planten die met cycloheximide zijn bespoten voordat ze aan licht worden blootgesteld, maken veel minder fenylalanine-deaminase en synthetiseren ook een veel geringere hoeveelheid hydroxykaneelzuren.

Hier hebben we een belangrijk punt van overeenkomst met andere fotomorfogenetische verschijnselen. Ook bij andere door licht bestuurd processen als bloei-inductie, bladontwikkeling, vorming van chloroplasten en anthocyaansynthese, is met behulp van bovengenoemde en andere verbindingen die de enzymsynthese remmen, vastgesteld dat enzymsynthese *de novo* een essentiële schakel is in het mechanisme dat aan de genoemde verschijnselen ten grondslag ligt. Om welke enzymen het bij de hier genoemde verschijnselen gaat, is nog een open vraag.

Om terug te keren tot de augurkekiemplant: we weten dus dat bij belichting van deze plant in het hypocotyl de enzymen fenylalanine-deaminase en kaneelzuurhydroxylase *de novo* gesynthetiseerd worden. Over de wijze waarop deze synthese geïnduceerd wordt, laat zich echter nog weinig zeggen. Er zijn aanwijzingen dat hierbij een factor betrokken is die onder invloed van licht in de cotylen gesynthetiseerd wordt en vandaar naar het hypocotyl wordt getransporteerd. Wanneer we vóór de belichting de cotylen verwijderen of deze bedekken met aluminiumfoelie, zodat dus alleen het hypocotyl wordt belicht, dan heeft dit een belangrijke vermindering in de stimulering van de aanmaak van beide enzymen en daarmee van de fenolsynthese ten gevolge. In blauw licht is deze vermindering ongeveer 50%, in rood en infrarood licht zelfs meer dan 90%. Belichten we intact zijnde planten korte tijd (b.v. 10 min) en wachten we enige tijd alvorens de cotylen

te verwijderen, dan vinden we een optimale kaneelzuurhydroxylase-activiteit wanneer het tijdsinterval tussen het begin van de belichting en het afsnijden van de cotylen minstens één uur bedraagt. Dit zou dan de tijd nodig voor synthese en transport van deze factor zijn.

Ook hier valt weer een punt van overeenkomst op met andere fotomorfogenetische verschijnselen, zoals b.v. de bloei-inductie. Voor deze laatste blijken de bladeren van de plant de percipiërende organen te zijn, vanwaar bloei-inducerende en/of bloeiremmende factoren naar de groeitoppen worden getransporteerd.

We hebben tot dusver bij de bestudering van de fenolsynthese alleen reguleringsmechanismen beschouwd die betrekking hebben op de enzymen die bij de totstandkoming van deze respons een rol spelen. Zoals in het volgende hoofdstuk zal blijken, bestaat hiernaast nog een reguleringsmechanisme dat gebaseerd is op de mogelijkheid van bepaalde omzettingen door licht in pigmentsystemen van de fotomorfogenese. Een eerste aanwijzing dat verschillende lichtsoorten de fenolsynthese verschillend beïnvloeden, zijn we zojuist reeds tegengekomen bij de behandeling van het effect van licht indien de cotylen verwijderd of bedekt worden.

#### Pigmentsystemen van de fenolsynthese

Vele door licht gereguleerde processen in de plant, waaronder ook de lengtegroei en de fenolsynthese bij de augurk, vertonen een verschijnsel dat wordt aangeduid als het rood-infrarood-antagonisme. Het beste laat dit verschijnsel zich demonstreren bij de zaadkieming. De zaden van sommige variëteiten sla b.v. kiemen in het donker slechts voor een klein percentage. Een geringe dosis rood licht is in staat het kiemingspercentage tot vrijwel 100 te brengen. Wordt direct aansluitend op deze bestraling infrarood licht gegeven, dan blijft dit percentage even klein als bij kieming in donker. Een hernieuwde bestraling met rood licht doet het zaad alsnog voor bijna 100% kiemen; infrarood licht doet deze invloed van rood licht weer teniet, enz. Zolang het tijdsinterval tussen de bestralingen niet te groot wordt, is het steeds de laatste lichtsoort die bepalend is. Ook bij andere door licht gereguleerde processen als anthocyaansynthese, chlorofylsynthese, opening van de plumulaire haak en bloei-inductie is dit verschijnsel uitvoerig onderzocht. Actiespectra laten steeds een maximum bij 660 nm voor het werkzame rode licht en één bij 730 nm voor het antagonistische infrarode licht zien.

Uit verschillende planten die dit rood-infrarood-antagonisme vertonen, is een pigment geïsoleerd, *fytochrom* genoemd, dat in twee vormen voorkomt,

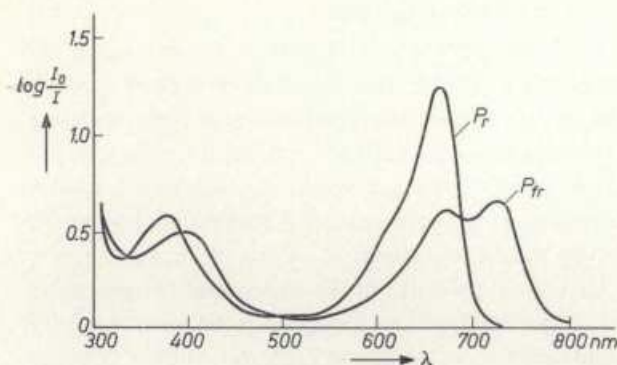


Fig. 5. Absorptiespectra van de in het rood (curve  $P_r$ ) en in het infrarood (curve  $P_{fr}$ ) absorberende vormen van uit haverzaailingen geïsoleerd fytochroom.  
(Ontleend aan Hendricks en Borthwick <sup>[11]</sup>.)

waarvan de een een absorptiemaximum heeft bij 660 nm, de ander bij 730 nm (fig. 5) <sup>[11]</sup>. *In vitro* is aangetoond dat bestraling bij deze golflengten de omzetting van de ene vorm in de andere ten gevolge heeft. Op grond van absorptieveranderingen neemt men aan dat ook *in vivo* deze fotoreversibiliteit bestaat. Rood licht zet kennelijk een niet-actieve vorm van het fytochroom om in een actieve, en infrarood licht doet het omgekeerde. Zolang een plant nog niet aan licht is blootgesteld, komt het fytochroom uitsluitend in zijn niet-actieve, bij 660 nm absorberende, vorm voor. De actieve, bij 730 nm absorberende, vorm verdwijnt *in vivo* langzaam in het donker op een nog onbekende manier. Hiermee correspondeert dat de invloed van rood licht zich in mindere mate laat opheffen naar gelang langer met de bestraling met infrarood licht wordt gewacht. Hoe de actieve vorm van fytochroom, dat een hoogmoleculair eiwit is, functioneert, is nog niet bekend. Gedacht wordt aan enzymwerking.

We moeten aannemen dat behalve fytochroom nog een ander, speciaal in het blauwe deel van het spectrum absorberend, pigment bij de fenolsynthese betrokken is. Dit blijkt wanneer we een actiespectrum van de inductie van kaneelzuurhydroxylaseactiviteit (curve *act* in fig. 6) vergelijken met de absorptiespectra van beide vormen van fytochroom (fig. 5). Waar deze laatste een minimum vertonen, laat het actiespectrum juist een maximum zien (bij 460 nm).

Het feit dat bij de fenolsynthese verschillende pigmentsystemen zijn betrokken, weerspiegelt zich in een verschil in afhankelijkheid van belichtingsduur en licht-

intensiteit voor verschillende lichtsoorten <sup>[13]</sup>. Een voorbeeld hiervan vinden we in fig. 7, waarin voor rood (curve *r*) en voor blauw licht (curve *b*) de fenolsynthese is gegeven als functie van de belichtingsduur. In rood licht wordt verzadiging bereikt in korter tijd dan in blauw licht, terwijl het verzadigingsniveau in de eerste lichtsoort veel lager is dan in de tweede. In tegenstelling tot het effect van blauw licht geldt voor dat van rood licht de zg. reciprociteitswet: effect = lichtintensiteit × belichtingsduur. Op het speciale rood-infrarood-antagonisme is al gewezen, evenals op een verschil tussen blauw en rood licht wat betreft de mate waarin percep-

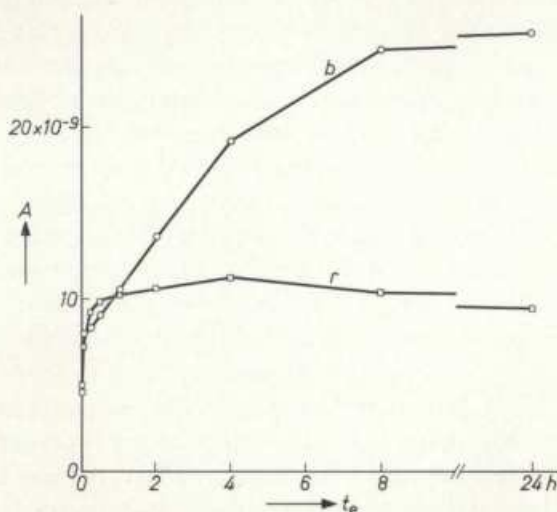


Fig. 6. De gedurende 24 uur gesynthetiseerde hoeveelheid A hydroxykaneelzuren per hypocotyl als functie van de belichtingsduur in rood (curve *r*) en in blauw licht (curve *b*) bij drie dagen oude, in het donker gekweekte augurkezaailingen. De hoeveelheid hydroxykaneelzuren is in mol opgegeven. Belichtingsintensiteit 800  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ .

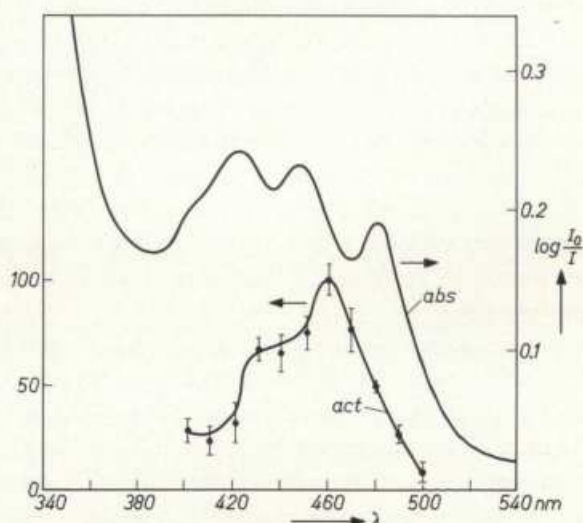


Fig. 7. Het actiespectrum voor de inductie van kaneelzuurhydroxylase-activiteit in segmenten van het hypocotyl van de augurk (curve *act*) en het absorptiespectrum van dezelfde segmenten (curve *abs*).

<sup>[10]</sup> K. H. Erismann, *Int. Z. Vitaminf.* **32**, 36, 1962.

<sup>[11]</sup> Twee recente overzichtsartikelen die respectievelijk betrekking hebben op de fysiologische betekenis en op de isolering van fytochroom zijn: S. B. Hendricks en H. A. Borthwick, in: *Chemistry and biochemistry of plant pigments* (red. T. W. Goodwin), Academic Press, Londen 1965, blz. 405, en W. L. Butler, S. B. Hendricks en H. W. Siegelman, *ibidem*, blz. 197. Zie ook: H. Mohr, *Photochem. Photobiol.* **5**, 469, 1966 (no. 6).

tie door de cotylen essentieel is voor de stimulering van de fenolsynthese in het hypocotyl.

Een aantal van deze punten duiden er op dat rood en blauw licht niet alleen via verschillende pigmentsystemen worden gepercipieerd, maar dat deze systemen ook verschillend functioneren. Een laag verzadigingsniveau, het rood-infrarood-antagonisme en het opgaan van de reciprociteitswet laten zich in een bepaald verband plaatsen wanneer we ervan uitgaan dat de werking van rood licht berust op het omzetten van een inactieve in een actieve vorm van fytochroom — daarbij in het midden latend waaruit deze activiteit bestaat. De wijze waarop het effect van blauw licht afhangt van de belichtingsduur en van de lichtintensiteit daarentegen wettigt de veronderstelling dat het effect van deze lichtsoort in eerste instantie berust op het aanslaan van een pigment dat vanuit deze toestand een bepaalde werking uitoefent, bij voorbeeld, evenals bij het primaire proces van de fotosynthese<sup>[2]</sup>, het teweegbrengen van een bepaald elektronentransport. Dit zou een keten van reacties in beweging kunnen stellen die uiteindelijk onder meer zou leiden tot een versnelde synthese van fenylalaninedeaminase en kaneelzuurhydroxylase.

De invloed van *infrarood licht* op de fenolsynthese vertoont een complicatie die we tot nu toe buiten beschouwing gelaten hebben. Aan de ene kant heeft een kleine dosis infrarood licht, indien het na rood licht wordt gegeven, een antagonistisch effect, hetgeen te verklaren is uit de omzetting van de actieve vorm van fytochroom in de inactieve vorm, maar aan de andere kant stimuleert een langdurige bestraling de fenolsynthese, waarbij het effect zelfs groter is dan dat van rood licht. De afhankelijkheid van belichtingsduur en van lichtintensiteit is ongeveer als voor blauw licht, maar wat betreft de belangrijkheid van de cotylen voor de lichtinvloed, komt infrarood licht met rood licht overeen. Ter verklaring van deze verschijnselen hebben we twee alternatieven: of infrarood licht wordt gepercipieerd door een afzonderlijk pigment, dat ongeveer op dezelfde manier als fytochroom verdeeld is over hypocotyl en cotylen, of fytochroom is toch het percipiërende pigment maar dit functioneert bij absorptie van infrarood licht op een analoge wijze als het pigment dat voor het effect van blauw licht verantwoordelijk is.

Samenvattend kunnen we zeggen dat bij de inductie door licht van de fenolsynthese naast fytochroom nog minstens één ander pigment is betrokken, dat gezien het in fig. 7 weergegeven actiespectrum (curve *act*) een maximum vertoont in de buurt van 460 nm en dat we zullen moeten zoeken te midden van allerlei andere pigmenten, getuige het verschil tussen dit actiespectrum en het in dezelfde figuur weergegeven absorptiespectrum van het hypocotyl van de augurk (curve *abs*).

### Fenolsynthese en lengtegroei

De lengtegroei wordt bepaald door processen van celdeling en celstrekking, die beide de invloed van licht ondergaan. Op het tijdstip waarop ons onderzoek naar de lengtegroei van het hypocotyl van de augurk begint, 72 uur na het uitzaaien, is een fase ingetreden waarbij de celstrekking overheerst. Wij zullen ons daarom beperken tot dit fenomeen.

De celwand wordt opgebouwd vanuit het protoplasma onder invloed van enzymatische processen. De wand bestaat uit cellulosevezels die worden bijeengehouden door een amorfe massa (matrix) van polysacchariden van gecompliceerde samenstelling. Volgens sommige onderzoekers bevat de celwand tevens structureel eiwit.

De celwand is ten dele elastisch, ten dele plastisch. Van binnen wordt hierop een druk uitgeoefend die bepaald wordt door het verschil in concentraties tussen de binnen en buiten de cel in oplossing aanwezige moleculen (osmose). Algemeen wordt thans aanvaard dat verandering van celstrekking gerealiseerd wordt door een verandering van de plasticiteit van de celwand, b.v. door het ontstaan of het verbreken van bepaalde banden in de matrix, en niet door drukverandering in de cel. Aangezien de cellulosevezels door het protoplasma in een bepaalde richting in de celwand worden neergelegd, zijn de plastische en elastische eigenschappen van de celwand niet in alle richtingen gelijk (anisotropie). Dit verklaart dat een cel onder invloed van de inwendige druk zich hoofdzakelijk in één bepaalde richting strekt<sup>[12]</sup>. Een toeneming van de plasticiteit van de celwand gaat gewoonlijk gepaard met een versnelde inbouw van nieuw matrixmateriaal, als regel gevolgd door verhoogde synthese van cellulose.

Een van de factoren die betrokken zijn bij de regulering van de lengtegroei is het groeihormoon indolylazijnzuur (IAA). Aangenomen wordt dat de concentratie van IAA op zijn beurt geregeld wordt door een beïnvloeding van de activiteit van het enzym dat IAA afbreekt, het IAA-oxydase<sup>[13]</sup>. Monofenolen activeren dit enzym, terwijl o-difenolen remmend werken. De eerste groep verbindingen zal dus door een versnelde afbraak de IAA-concentratie in de cel verlagen, terwijl de tweede een IAA-sparende werking vertoont. Geheel in overeenstemming hiermee is bij een aantal planten gevonden dat monofenolen, waaronder p-cumaarzuur, de celstrekking remmen, terwijl o-difenolen en andere nauwverwante verbindingen als ferulazuur een groeibevorderende werking vertonen<sup>[14]</sup>.

Hier ligt een belangrijk aanknopingspunt met wat we in het vorige hoofdstuk hebben behandeld: de stimulering van de synthese van hydroxykaneelzuren door licht. Onder invloed van licht wordt nl. een verschuiving teweeggebracht in de balans van groeirem-

mende en groeibevorderende fenolen.

Wordt de in het donker gekweekte kiemplant in het licht gebracht, dan begint hij in de eerste plaats veel p-cumaarzuur te maken, dat, zoals we gezien hebben, groeiremmend werkt. Remming van de lengtegroei is ook hetgeen we constateren. In een later stadium wordt meer ferulazuur gemaakt, dat een tegengestelde werking heeft. Hiermee correspondeert dat de groeiremming als regel door een maximum gaat. Maar, hoewel ook verdere experimentele gegevens in overeenstemming zijn met de hier geschetste hypothese, b.v. het feit dat de groeistofconcentratie verlaagd wordt in het hypocotyl door belichten van de plant, blijkt toch dat dit mechanisme alléén geen volledige verklaring kan geven voor de remming van de lengtegroei door licht. Het causale verband dat hierbij verondersteld wordt tussen fenolsynthese en verandering van de lengtegroei, houdt in dat deze laatste een minstens even lange aanlooperperiode zou moeten vertonen als die voor de fenolsynthese, en dus minstens  $1\frac{1}{2}$  uur zou moeten bedragen (fig. 2). Dit nu is niet het geval. Althans niet voor belichting met blauw licht, waarbij de groei reeds binnen de eerste minuut wordt geremd (fig. 8). In rood en in infrarood licht varieert de aanlooperperiode van de groeiremming voor individuele planten van ongeveer 30 minuten tot ruim  $2\frac{1}{2}$  uur, zodat we komen tot een gemiddelde van ongeveer dezelfde grootte als de aanlooperperiode voor de fenolsynthese. Voor deze lichtsoorten is de geschetste mogelijkheid dat de fenolsynthese de primaire oorzaak zou zijn van de groeiremming dus wel aanwezig, hoewel het moeilijk is definitieve conclusies te trekken [15].

We willen thans nagaan of er nog andere wegen zijn waarlangs licht zijn invloed zou kunnen doen gelden.

Evenals bij de fenolsynthese speelt ook bij de lengtegroei eiwit- of enzymsynthese *de novo* een belangrijke rol. Dit blijkt uit de groeiremmende werking van remstoffen van de eiwitsynthese, zoals actinomycine D en cycloheximide. We kunnen in dit verband denken aan de synthese van structureel eiwit voor de celwand of aan de synthese van enzymen die zorgen dat andere bouwstenen, zoals cellulose, geproduceerd worden. De invloed van licht zou nu kunnen berusten op een beïnvloeding van de snelheid waarmee deze eiwitsynthese *de novo* plaatsvindt. Hier stuiten we echter op dezelfde moeilijkheid als bij het voorafgaande. Op grond van de voor dit mechanisme te verwachten aanlooperperiode zou hiermee wel de groeiremming door rood en door infrarood licht verklaard kunnen worden, maar niet de remming door blauw licht.

De zeer snelle invloed van blauw licht op de groeisnelheid wekt het vermoeden dat deze lichtsoort een proces beïnvloedt dat direct betrokken is bij de plasticiteitsveranderingen in de celwandmatrix. Een in dit

verband aantrekkelijke hypothese is dat deze plasticiteitsveranderingen worden teweeggebracht door het zich openen en sluiten van disulfidebanden door gecontroleerde reductie en oxidatie. Hiermee zouden we een aanknoping verkrijgen met hetgeen in het vorige hoofdstuk als mogelijkheid is genoemd, nl. dat de primaire werking van blauw licht bestaat uit het teweegbrengen van een bepaald elektronentransport, d.i. een oxidatie-reductiereactie.

Deze te openen en te sluiten disulfidebanden zouden volgens de vermelde hypothese deel uitmaken van het structurele eiwit van de celwand [16]. Dit mechanisme

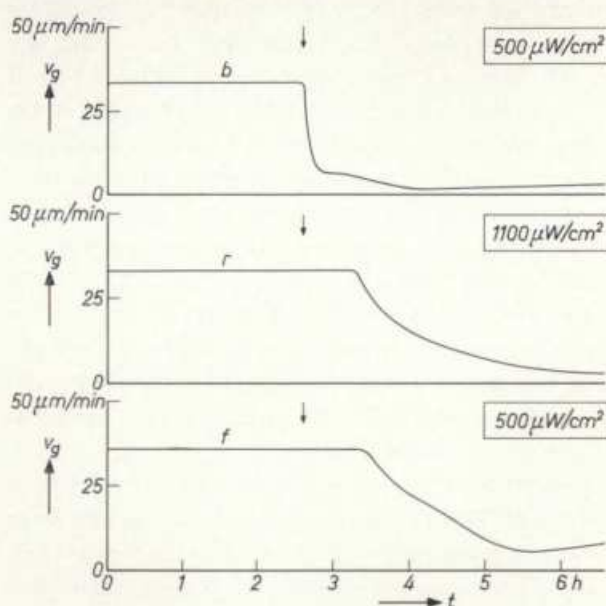


Fig. 8. Groeisnelheid  $v_g$  van drie dagen oude, in het donker gekweekte augurkekiemplanten die op het door een pijl aangegeven tijdstip met respectievelijk blauw (curve *b*), rood (curve *r*) en infrarood licht (curve *f*) werden bestraald. (Naar onderzoeken van dr. G. Meijer in dit laboratorium.)

sluit aan bij een analoog proces bij gist, nl. de knopvorming die ontstaat door een plaatselijke verslapping van de celwand [17]. Aangetoond is dat deze wordt veroorzaakt door reductie van de disulfidebanden in een polysaccharide-eiwitcomplex door een specifiek enzym, eiwitdisulfidereductase, dat voor zijn werking afhankelijk is van een gereduceerde cofactor. Licht zou de cofactor kunnen oxideren, op deze wijze de enzymactiviteit reguleren en zo de lengtegroei remmen. Een

[12] P. A. Roelofs, in: *Advances in botanical research* (red. R. D. Preston), Academic Press, Londen 1965, blz. 69.

[13] W. S. Hillman en A. W. Galston, *Plant Physiol.* **32**, 129, 1957.

[14] J. P. Nitsch en C. Nitsch, *Ann. Physiol. vég.* **4** (3), 211, 1962.

[15] De relatie tussen lichtinvloeden op de fenolsynthese en de ontwikkeling van de kiemplant is eveneens onderzocht voor erwtezaailingen; zie M. Furuya en R. G. Thomas, *Plant Physiol.* **39**, 634, 1964, en W. Bottomley, H. Smith en A. W. Galston, *Phytochem.* **5**, 117, 1966.

[16] D. T. A. Lampion, in: *Advances in botanical research* (red. R. D. Preston), Academic Press, Londen 1965, blz. 151.

[17] W. J. Nickerson, *Bacteriol. Rev.* **27**, 305, 1963.

dergelijk mechanisme zou een snel effect van licht op de lengtegroei, zoals we dat vinden bij belichting met blauw licht, kunnen verklaren.

Samenvattend kunnen we concluderen dat de effecten van rood en van blauw licht ook hier via verschillende pigmentsystemen tot stand komen en vermoedelijk ook via verschillende mechanismen worden gerealiseerd.

### Nabeschouwing

In een levend organisme hangt zowat alles met alles samen. De opbouw van hoogmoleculaire verbindingen als DNA, RNA en enzymen komt in nauwe afhankelijkheid tot stand. Deze verbindingen bepalen tevens welke laagmoleculaire verbindingen er worden gemaakt. Sommige hiervan beïnvloeden op hun beurt de relatie tussen de hoogmoleculaire verbindingen en bepalen, vaak weer in samenwerking met deze verbindingen, de snelheid waarmee andere metabolische processen plaatsvinden. Een ingreep van buiten af kan in dit systeem een vergaande verschuiving ten gevolge hebben. Zo ook belichting.

Een methode die gevolgd kan worden bij het opsporen van de reguleringsmechanismen van de plant, is na te gaan hoe het metabolisme een lichtprikkel verwerkt. We zoeken daarbij in de eerste plaats naar begin- en eindpunten van dit proces.

Beginpunten zijn de pigmenten die het werkzame licht percipiëren. Eindpunten vinden we ten dele in de vorm van bepaalde structuren waarvan de functie reeds een zekere onveranderlijkheid impliceert, zoals b.v. de celwand, ten dele in de vorm van bepaalde verbindingen die niet, of althans niet snel, verder worden gemetaboliseerd, zoals sommige fenolachtige verbindingen, die zich waarschijnlijk in de vacuoles ophopen.

De verschillen in de wijze waarop licht van verschillende golflengtegebieden de fenolsynthese stimuleert, vinden we terug bij verscheidene andere fotomorfogenetische verschijnselen. Dit wettigt de conclusie dat er een vrij grote mate van overeenstemming moet bestaan tussen de hierbij betrokken pigmentsystemen.

Voor elke eindfase kunnen we stellen dat ze tot stand komt onder invloed van bepaalde enzymen. Bij de fenolsynthese vonden we dat licht de aanmaak van de hierbij betrokken enzymen stimuleert. Ook dit bleek een punt van overeenstemming met andere fotomorfogenetische verschijnselen te zijn.

Verder zijn er nog andere verbindingslijnen te trekken. Zo hebben we de snelle groeiremming in blauw licht in verband gebracht met een bepaald oxidatie-reductie-

proces. Hier stellen we het feit naast dat beide bij de fenolsynthese betrokken enzymen, om te kunnen functioneren, afhankelijk zijn van bepaalde gereduceerde cofactoren. In de inleiding hebben we reeds vermeld dat licht de synthese stimuleert van ascorbinezuur, een verbinding die geacht wordt een belangrijke rol te spelen bij het oxidatie-reductie-evenwicht in de cel. We vermoeden hier bepaalde verbanden, maar dit zijn nog slechts speculaties.

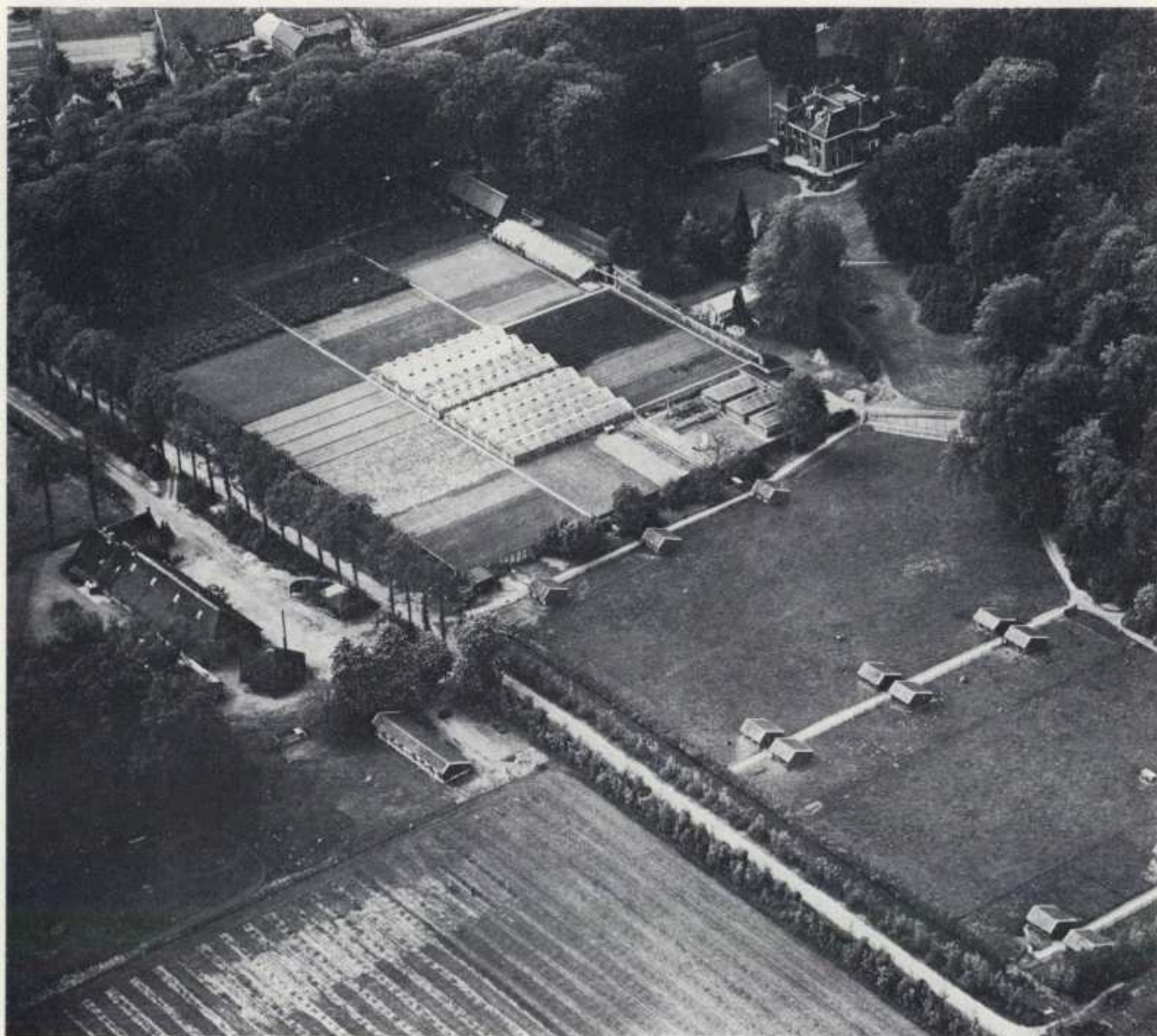
Ten slotte willen we er nog op wijzen dat de fenolsynthese in het hypocotyl van de augurk voor een belangrijk deel bepaald wordt door een factor die onder invloed van licht in de cotylen wordt gesynthetiseerd. Hiermee zijn we gekomen op een punt waar de fenomenologische beschouwing in het begin ons ook reeds gebracht had, nl. dat de fotomorfogenetische verschijnselen slechts ten dele als geïsoleerde fenomenen kunnen worden bestudeerd, aangezien een onderlinge wisselwerking inherent is aan deze verschijnselen. Om te begrijpen wat er zich in het hypocotyl afspeelt, komen we er niet onderuit ook de door licht geïnduceerde veranderingen in de cotylen in onze beschouwingen te betrekken. In dezelfde periode waarin licht de lengtegroei van het hypocotyl remt en er hydroxykaneelzuren doet ophopen, beginnen de cotylen uit te dijen, worden de voorraadstoffen erin afgebroken, chloroplasten gevormd, ascorbinezuur en een verscheidenheid aan fenolen gesynthetiseerd. En dit is dan nog maar een deel van de legkaart waarvan we in dit artikel een paar stukjes aan elkaar hebben proberen te passen.

---

**Samenvatting.** Het artikel behandelt de stimulering door licht van de synthese van de fenolen p-cumaarzuur en ferulazuur in het hypocotyl van de augurkekiemplant. Aangetoond wordt dat dit geschiedt door een versnelde aanmaak uit de aminozuren van de bij de synthese van deze fenolen betrokken enzymen, fenylalaninedeaminase en kaneelzuurhydroxylase. Tevens wordt aangetoond dat minstens twee pigmentsystemen, het voor rood en infrarood licht gevoelige fytochroom en een speciaal in het blauwe gebied absorberend pigment, bij de door licht geïnduceerde fenolsynthese een rol spelen. Speciale aandacht wordt geschonken aan een mogelijk verband tussen de stimulering van de fenolsynthese en de remming van de lengtegroei van de augurkekiemplant door licht, in verband met het feit dat fenolen betrokken zijn bij de regulering van de concentratie van het groeihormoon indolylazijnzuur.

Het onderzoek is voornamelijk gericht op het verkrijgen van een beter inzicht in de reguleringsmechanismen van de plant. Omzetting van fytochroom door licht in een fysiologisch actieve of inactieve vorm, inductie en repressie van de synthese van de enzymen fenylalaninedeaminase en kaneelzuurhydroxylase, en activering en inactivering van het enzym dat het groeihormoon indolylazijnzuur afbreekt, vormen hiervan verschillende aspecten, die bij de hier beschreven fotomorfogenetische verschijnselen naar voren komen.

## Het Agrobiologisch Laboratorium Boekesteyn



Luchtfoto van „Boekesteyn” te 's-Graveland, een landgoed daterende uit de 17de eeuw, dat is ingericht tot een agrobiologisch laboratorium van de N.V. Philips-Duphar. De gronden die bij het landgoed behoren, zijn ingericht voor veldproeven op kleine schaal, terwijl er tevens kassen zijn gebouwd, waarin grote aantallen planten worden gekweekt ten behoeve van het onderzoekingswerk <sup>[1]</sup>.

In Boekesteyn onderzoekt men de chemische verbindingen die in de Researchlaboratoria te Weesp gesynthetiseerd worden, op hun werking tegen spintmijten, insecten, schimmels, onkruiden en nematoden. Tevens wordt er onderzoek gedaan naar het biochemische en fysisch-chemische gedrag van deze potentiële

bestrijdingsmiddelen, zowel in als op planten, in de grond en in geïsoleerde enzysystemen.

De van land tot land bestaande verschillen in klimatologische en andere omstandigheden maken het voor een verantwoorde toepassing van een bestrijdingsmiddel noodzakelijk om het in het land zelf aan uitgebreide veldproeven te onderwerpen. Na toetsing van de werkzaam bevonden verbindingen op de proefvelden en boomgaarden van Boekesteyn volgt derhalve nog een heel programma van veldproeven op grotere schaal, in Nederland en in diverse andere landen van de wereld.

<sup>[1]</sup> Zie ook R. van der Veen, Philips techn. T. 16, 353, 1954.

# Het vernevelen van geconcentreerde dispersies van pesticiden

W. Duyfjes

De ontdekking van de insecticide werking van DDT in 1939 heeft de stoot gegeven tot een grootscheeps onderzoek naar nieuwe chemische bestrijdingsmiddelen tegen de vele plagen in land- en tuinbouw. Dit onderzoek heeft honderden bestrijdingsmiddelen opgeleverd, waaronder enkele tientallen die van grote waarde zijn voor het vergroten van de opbrengst per areaal van de verschillende gewassen.

Van de chemische bestrijdingsmiddelen of pesticiden (waartoe behoren insecticiden, acariciden, fungiciden en herbiciden) zijn in het algemeen slechts kleine hoeveelheden nodig om het gewenste effect te bereiken, b.v. 100 gram tot enkele kilogrammen per ha. De kosten van de eigenlijke actieve stof zijn hierdoor meestal vrij laag; het verspreiden van deze stof over het gewas levert echter zo vele problemen op dat het toepassen van pesticiden in de land- en tuinbouw toch een kostenfactor van betekenis is. De actieve stof kan meestal niet zonder meer op het gewas worden gebracht, maar moet door het toevoegen van een aantal hulpstoffen eerst in een vorm worden gebracht waarin ze verspreid kan worden en waarin tevens de pesticide werking zo doeltreffend mogelijk is — deze bewerking noemt men het *formuleren* van de stof<sup>[1]</sup>.

Het verspreiden van een pesticide over het gewas kan op verschillende wijzen gebeuren, nl. door spuiten, sproeien of vernevelen van een vloeistof, door stuiven van een poeder, en in enkele gevallen door middel van rook. Spuiten, sproeien en vernevelen zijn de meest toegepaste methodes, ze verschillen voornamelijk in de hoeveelheid vloeistof die per ha wordt verspreid. Men spreekt meestal van spuiten als deze hoeveelheid zeer groot is (b.v. meer dan 500 l/ha), van vernevelen als het om kleine hoeveelheden gaat (10 à 50 l/ha), en in het tussengebied van sproeien; de termen sproeien en vernevelen worden echter veel verwisseld. De vloeistof die wordt verspreid, is meestal een dispersie (emulsie of suspensie), de meeste pesticiden zijn nl. niet oplosbaar in water.

Een groot bezwaar bij het spuiten is dat met de gebruikelijke apparaten een gelijkmatige verdeling

van de actieve stof over het gewas alleen kan worden bereikt als de spuitvloeistof sterk is verdund. Veelal is hiervoor minstens 500 l verdunningsmiddel (meestal water) per ha nodig. Als een groot areaal op deze wijze moet worden bespoten, heeft dit als consequentie dat de tank van het apparaat herhaaldelijk moet worden gevuld; het is duidelijk dat dit de kosten aanzienlijk verhoogt, vooral bij toepassing vanuit vliegtuigen. Het blijkt nu mogelijk te zijn de vereiste hoeveelheid vloeistof per ha aanzienlijk te verminderen, soms zelfs tot op een tiende en minder van de oorspronkelijke. Het verdelen van deze kleine hoeveelheden geconcentreerde dispersies stelt echter hoge eisen aan de sproei- en nevelapparaten en aan de formulering.

Bij vernevelen vanuit de lucht is het voorts van groot belang ervoor te zorgen dat de „deponeerbaarheid” voldoende groot is, d.w.z. dat de druppels de grond bereiken en niet door de wind worden meegevoerd. Deze zg. sproeidrift kan met name bij het toepassen van herbiciden desastreuze gevolgen hebben voor belendende percelen land waarop gewassen worden gekweekt. Men kan de deponeerbaarheid vergroten door met speciale technieken ervoor te zorgen dat geen te kleine druppels ontstaan, en door stoffen toe te voegen die de verdamping remmen zodat grote druppels niet tijdens de val zo klein worden dat ze alsnog wegwaaien. Vooral bij geconcentreerde dispersies is het moeilijk om daarenboven nog de stabiliteit te handhaven, zodat emulsies niet voortijdig breken (d.w.z. ontmengen, uiteenvallen in olie en water) en suspensies niet uitvlokken.

Bij sproeien vanuit de lucht bestaat ook steeds meer de behoefte om verschillende preparaten tegelijk te verspreiden. Dit levert problemen doordat b.v. bij het mengen van een emulsie en een suspensie de dispersies veelal „onverenigbaar” blijken te zijn. Het mengsel kan dan uitvlokken en een brij vormen die het sproei-systeem totaal verstopt.

In dit artikel zullen we de genoemde problemen bespreken. We zullen hiertoe eerst in het kort de emulsies en de suspensies behandelen. Aan het slot zal de zg. invert-emulsie worden beschreven, een dispersie met bijzondere eigenschappen die mogelijk voor enkele problemen een bruikbare oplossing zal kunnen geven.

*Ir. W. Duyfjes, medewerker van N.V. Philips-Duphar, Ontwikkelingslaboratoria te Amsterdam.*

## Emulsies

Pesticiden die als emulsie kunnen worden versproeid, worden meestal in de handel gebracht als emulgeerbare olie, dat is een olie die bij mengen met water spontaan een emulsie van het type olie-in-water vormt. Soms is de olie zelf de actieve stof, meestal is de actieve stof in een aromatenrijke koolwaterstofolie opgelost. Een emulgeerbare olie bevat voorts een emulgator, dat is een stof die het emulgeren van de olie in water mogelijk maakt en tevens de emulsie stabiliseert. Aanvankelijk waren bepaalde zepen bruikbare emulgatoren; emulgeerbare oliën waren toen duur omdat van deze zepen een relatief hoog percentage nodig was om een goede emulgeerbaarheid te waarborgen. Tegenwoordig beschikt men echter over emulgatoren die veel effectiever zijn en veel beter bestand tegen hard water. Men kan nu met een veel lager percentage van de emulgator volstaan.

Deze nieuwe emulgatoren zijn mengsels van twee typen emulgatoren, nl. hydrofiele (d.w.z. met een affiniteit tot water) en lipofiele (met een affiniteit tot oliën). De hoge werkzaamheid van deze mengsels wordt veroorzaakt door een complexe selectieve adsorptie aan het grensvlak van olie en water: moleculen van de twee soorten emulgatoren zijn hierbij als het ware aan elkaar verankerd en vormen daardoor een hechte, stabiele grensvlaklaag. Als hydrofiele emulgatoren worden gebruikt polyglycolethers van gealkyleerde fenolen of partiële esters van sorbitol; als lipofiele, alkylbenzeensulfonaten, b.v. calciumdodecylbenzeensulfonaat. Met goed uitgebalanceerde mengsels van deze stoffen is een gehalte van 3 à 5% in de emulgeerbare olie al voldoende om deze in water spontaan te emulgeren tot een olie-in-water-emulsie.

De werkzaamheid van deze emulgatorencomposities is het hoogst bij grote verdunningen van de olie in water (b.v. 1:100 of 1:1000). Voor de geconcentreerde olie-in-water-emulsies die men tegenwoordig wil versproeien (1:10, 1:5 of nog hogere concentraties), zijn ze minder geschikt<sup>[2]</sup>; er treedt daarbij nl. geen optimale oriëntatie van de emulgatormoleculen aan het grensvlak olie-water op. Geconcentreerde emulsies breken daardoor soms binnen enkele minuten en vertonen dan een totale scheiding van de olie- en de waterfaze. Vaak ontstaat er ook bij hoge concentraties een zg. multiële emulsie, dat is een emulsie waarbij in de gedispergeerde olie-faze weer een waterfaze is gedispergeerd (fig. 1); dergelijke complexe emulsies kunnen op normale wijze worden versproeid. In bepaalde gevallen kan echter een totale faze-omkeer optreden, waarbij de olie-in-water-emulsie omslaat in een water-in-olie-emulsie. Deze emulsie, die aan het eind van dit artikel nog uitvoerig zal worden besproken, kan zeer viskeus zijn, vooral als de verhouding olie:water

ongeveer 1:3 of 1:4 is. De viscositeit neemt nog toe als de emulsie wordt geroerd; aangezien bij het sproeien van een geconcentreerde vloeistof in het sproeiapparaat bijna altijd sterk wordt geroerd, wordt de emulsie daarbij zo dik dat ze niet meer versproeid kan worden.

De genoemde verschijnselen worden veroorzaakt door de lipofiele componenten in het emulgatorenmengsel; deze bevorderen nl. het ontstaan van water-in-olie-emulsies. Voor het vernevelen van zeer geconcentreerde



Fig. 1. Microfoto van een multiële emulsie. In de geëmulgeerde oliedruppels van de olie-in-water-emulsie zijn weer kleine waterdruppeltjes geëmulgeerd. Vergroting 230×.

olie-in-water-emulsies is klaarblijkelijk een emulgatorencompositie noodzakelijk waarin alleen hydrofiele emulgatoren voorkomen — deze bevorderen het ontstaan van olie-in-water-emulsies. Dergelijke emulgatoren zijn echter alleen effectief als het gehalte ervan hoog is; daardoor zijn ze duur in het gebruik. In de hierboven vermelde werking van lipofiele stoffen op geconcentreerde emulsies ligt ook de oorzaak van de moeilijkheden die optreden als we deze emulsies mengen met suspensies.

## Suspensies

Pesticiden die als suspensie worden versproeid, worden meestal in de handel gebracht als een poeder dat met water dient te worden gemengd. Deze poeders worden aangeduid als „verspuitbare poeders”. Ze bestaan uit een vaste draagstof die innig is gemengd met de actieve stof en met enkele hulpstoffen (dit is b.v. gebeurd door de stoffen gezamenlijk te malen). Als draagstof worden b.v. natuurlijke of synthetische

[1] W. Duyfjes, Het formuleren van pesticiden, Philips techn. T. 19, 170-181, 1957.

[2] W. Duyfjes, A breaking phenomenon of an oil/water emulsion, The formulation of pesticides, S.C.I. Monograph No. 21, 89-96, 1966.

silicaten gebruikt of colloïdaal kiezelzuur. Als hulpstoffen bevatten verspuitbare poeders een zg. bevochtiger en een dispergeermiddel. De bevochtiger is een stof die de grensvlakspanning van water zo verlaagt dat het poeder door water wordt bevochtigd, en er bij menging met water een suspensie ontstaat; het dispergeermiddel zorgt ervoor dat deze suspensie niet uitvlokt.

De kwaliteit van de verspuitbare poeders is in de laatste jaren op een hoog niveau gekomen. Dit komt enerzijds door de grote vooruitgang in de maaltechniek, anderzijds door het gebruik van de bovengenoemde draagstoffen, die bijzonder geschikt zijn gebleken. Door het toepassen van deze draagstoffen kon tevens het gehalte aan actieve stof in de verschillende preparaten aanzienlijk worden verhoogd.

Bij het aanlengen van de verspuitbare poeders met water is het van belang dat de gebruiksaanwijzing strikt wordt opgevolgd. Het poeder moet nl. meestal eerst met weinig water worden aangeroerd tot een brij; de oppervlak-actieve stoffen lossen dan snel in het water op en vormen een geconcentreerde oplossing, waarvan de grensvlakspanning laag genoeg is om een snelle bevochtiging en vooral een zo volledig mogelijke adsorptie van de bevochtiger en het dispergeermiddel aan de vaste deeltjes te verkrijgen. Wordt deze brij daarna aangelengd met water, dan ontstaat een suspensie die urenlang stabiel kan blijven, zelfs bij verdunningen van 1:100 of 1:1000. Wanneer men echter het poeder rechtstreeks met een grote hoeveelheid water mengt, kan de adsorptie van de oppervlak-actieve stoffen aan de vaste deeltjes niet of slechts onvoldoende tot stand komen, waardoor de suspensie niet stabiel is en na enkele minuten gaat uitvlokken.

Men zou verwachten dat in spuitpoeders die zijn geformuleerd om als *geconcentreerde* suspensie te worden verneveld, met minder oppervlak-actieve stoffen kan worden volstaan. De draagstoffen die tegenwoordig worden gebruikt, zijn echter zo fijn verdeeld (deze poeders hebben soms een totale oppervlakte van enkele honderden m<sup>2</sup> per gram) dat ze een belangrijk deel van de hulpstoffen opslorpen, zodat toch ook bij hoge concentraties een tamelijk hoog gehalte (enkele procenten) aan bevochtigers en dispergeermiddelen noodzakelijk is. De geconcentreerde suspensies die hiermee ontstaan, zijn (in tegenstelling tot de geconcentreerde emulsies) zeer stabiel, tenminste indien het poeder weer eerst met weinig water is aangeroerd.

Het nadeel van het hoge gehalte aan oppervlak-actieve stoffen is dat bij het roeren van de geconcentreerde suspensie in het sproeiapparaat een overmatig schuimen optreedt, zodat men, om overlopen van de tank te voorkomen, deze slechts voor een deel kan

vullen. Dit schuimen kan op zijn beurt effectief worden bestreden door het toevoegen van anti-schuimstoffen (stoffen op basis van koolwaterstofoliën of siliconen). Hierbij dreigt echter weer het gevaar dat deze stoffen als gevolg van het sterke roeren in de suspensie kunnen worden geëmulgeerd, waardoor de suspensie, die oorspronkelijk zeer stabiel was, plotseling sterk kan gaan uitvlokken (*fig. 2a en b*). Van deze anti-schuimstoffen mag dus slechts een kleine hoeveelheid worden toegevoegd. Uit dit alles blijkt wel dat spuitpoeders voor geconcentreerde suspensies een zeer zorgvuldige formulering vereisen.

### Het mengen van geconcentreerde emulsies en suspensies

In de praktijk van het besproeien van gewassen bestaat in toenemende mate de behoefte om twee verschillende pesticiden tegelijk toe te passen en men wil dan liefst de twee preparaten reeds in de tank van het sproeiapparaat mengen. Als het een emulsie en een suspensie betreft, geeft dit in sommige gevallen moeilijkheden (breken en uitvlokken), vooral als de suspensie sterk lipofiele stoffen bevat. Bij het vernevelen van mengsels van geconcentreerde dispersies doen deze problemen zich in nog sterkere mate voor. We hebben hierboven gezien dat geconcentreerde emulsies in het algemeen tamelijk labiel zijn als gevolg van een gedisorganiseerde toestand van de geadsorbeerde emulgatormoleculen aan het grensvlak van de gedispergeerde oliëfaze. De geconcentreerde suspensies die uit verspuitbare poeders zijn bereid, zijn relatief stabiel, mits ze op de juiste wijze zijn behandeld. Als deze dispersies worden gemengd, wordt echter in beide vloeistoffen de evenwichtstoestand en daarmee de stabiliteit verbroken, zodat na een bepaalde tijd breking en uitvloking optreedt. Is de suspensie onvolledig gestabiliseerd doordat het poeder niet goed is aangeroerd, of, erger nog, stort men het spuitpoeder rechtstreeks in de emulsie, dan vlokt het mengsel zeer snel uit.

Een lichte mate van uitvloking betekent nog niet altijd dat de dispersie niet meer versproeid kan worden; als er tijdens het sproeien wordt geroerd, is sproeien veelal nog mogelijk. Het leidt echter meestal wel tot een teruglopen van de activiteit van de vernevelde druppels op het object. Dit is vooral bij een aantal fungiciden — die meestal in de vorm van suspensies worden verspoten of verneveld — een groot nadeel. Voor deze stoffen geldt meer nog dan voor de andere pesticiden, dat het essentieel is dat een voldoende groot aantal deeltjes het te beschermen oppervlak bedekt, ten einde contact met alle schimmelsporen mogelijk te maken.

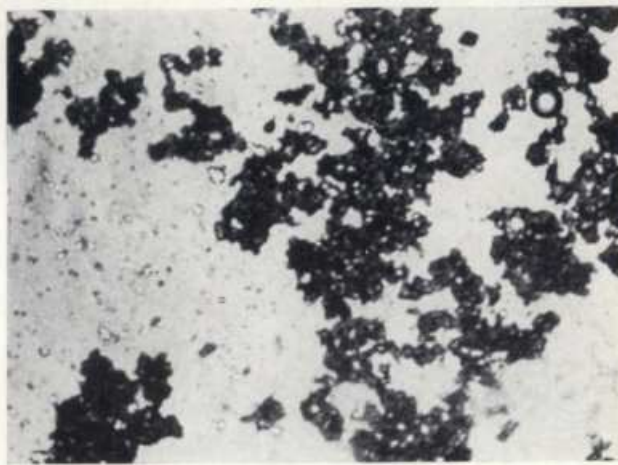
In deze toch al ingewikkelde situatie kan een fatale complicatie optreden als de actieve stof uit de suspensie in zekere mate oplosbaar is — al dan niet in com-

binatie met een hulpstof — in de olie van de emulsie. De vaste deeltjes uit de suspensie kunnen dan nl. naar de geëmulgeerde olie migreren, zich daar ter plaatse ophopen en geheel of ten dele in deze olie oplossen. Dit kan leiden tot een verstoring van de grensvlaklaag van de emulsie, met als gevolg een grotere instabiliteit. Dit verschijnsel doet zich b.v. voor bij het mengen van een emulsie van „Malathion”<sup>[\*]</sup> met een suspensie van thiram (tetramethylthiuramdisulfide); laatstgenoemde stof is sterk lipofiel en onoplosbaar in water. Met

beeld van deze werking; een mengsel van een emulsie van DDT en een suspensie van zineb (een fungicide) is in hoge mate onverenigbaar (fig. 4a); in hetzelfde mengsel blijven de emulsie en de suspensie zeer fijn gedispergeerd als er een colloïde aan is toegevoegd (fig. 4b). Het gebruik van een colloïde kan echter ook leiden tot een verlaging van de effectiviteit van één of zelfs van beide actieve stoffen in het mengsel. Vooral colloïden die sterk hydrofiel zijn, kunnen het vrijkomen van de actieve stof op het object belemmeren,



a



b

Fig. 2. Microfoto's van een suspensie van DDT. Vergroting 110×.

a) Zonder toevoeging van een anti-schuimstof is de suspensie stabiel.

b) Na toevoeging van een anti-schuimstof is de suspensie sterk uitgevlokt. Door het roeren in het sproeiapparaat is de stof in de suspensie geëmulgeerd en heeft hij de stabiliteit verstoord.

dit mengsel zouden in de fruitteelt tegelijkertijd bladluizen en spintmijten („Malathion”) en sporen van schadelijke schimmels (thiram) kunnen worden bestreden. Dit mengsel is een duidelijk voorbeeld van dit soort onverenigbaarheid (zie fig. 3a en b): de suspensie vlokt nagenoeg geheel uit en de emulsie vertoont een voortijdige coalescentie (samenvloeien van de gedispergeerde fase, dit is de inleiding tot het breken).

Er zijn enkele mogelijkheden om mengsels die gewoonlijk door bepaalde eigenschappen van de actieve stoffen of van de draagstoffen onverenigbaar zijn, verenigbaar te maken. Meestal kan men dit bereiken door de compositie van een van de preparaten te wijzigen, en wel voornamelijk de emulgatorencompositie. Indien dit economisch niet verantwoord is, kan soms de toevoeging van een zeer specifiek werkend colloïde beide dispersies voldoende stabiliseren. Fig. 4 geeft een voor-

doordat ze als de versproeide druppels zijn opgedroogd, de actieve stof omhuld en ingesloten houden.

#### Enkele fysische aspecten van de versproeide druppels

Bij elke sproeitechniek behoort een bepaalde verdeling van de grootte van de versproeide druppels. Deze verdeling wordt bepaald door een aantal fysische eigenschappen van de vloeistof, waarvan de viscositeit en de oppervlakspanning de voornaamste zijn. Als kenmerk van de sproeitechniek is hier de druk waarmee de vloeistof wordt verneveld het belangrijkste, vooral wanneer het sterk viskeuze oplossingen of dispersies betreft.

Het is duidelijk dat bij sproeien vanuit de lucht, klimatologische factoren de druppelverdeling nog in

[\*] „Malathion” is een produkt van American Cyanamid Company, Wayne, N.J., U.S.A.

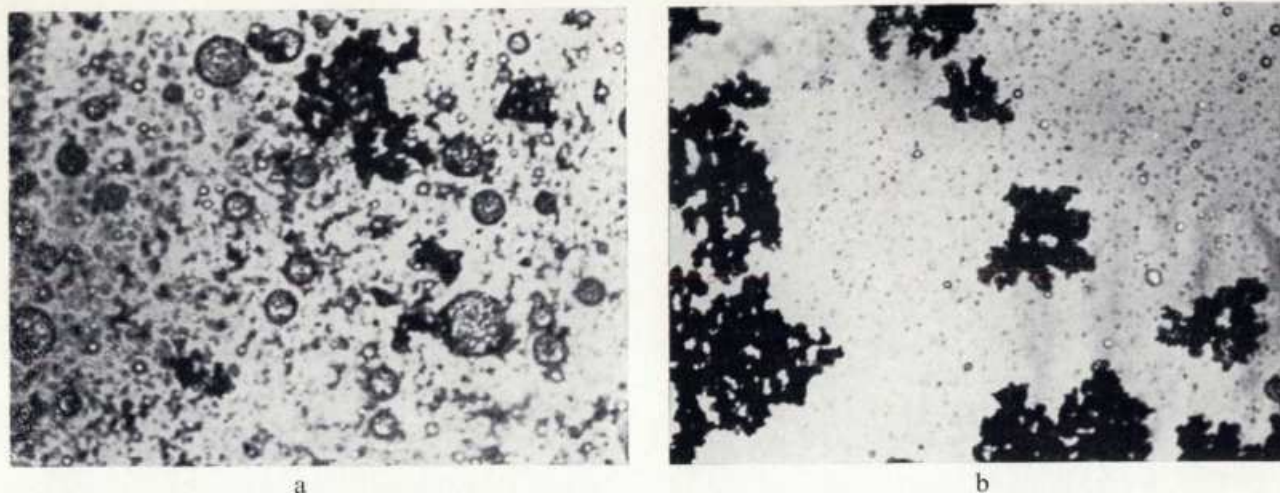


Fig. 3. Microfoto's van een mengsel van een emulsie van „Malathion” met een suspensie van thiram. De stabiliteit van beide dispersies wordt verstoord doordat het thiram de olie van de emulsie opslorpt. Vergroting  $110\times$ .

- a) De situatie kort na het mengen. De emulsie begint al te coalesceren en de suspensie begint uit te vlokken.  
b) In de eindtoestand is de suspensie geheel uitgevlokt in grote klonten waarin ook het grootste deel van de olie is opgenomen. Nog slechts een klein deel van de olie is geëmulgeerd.

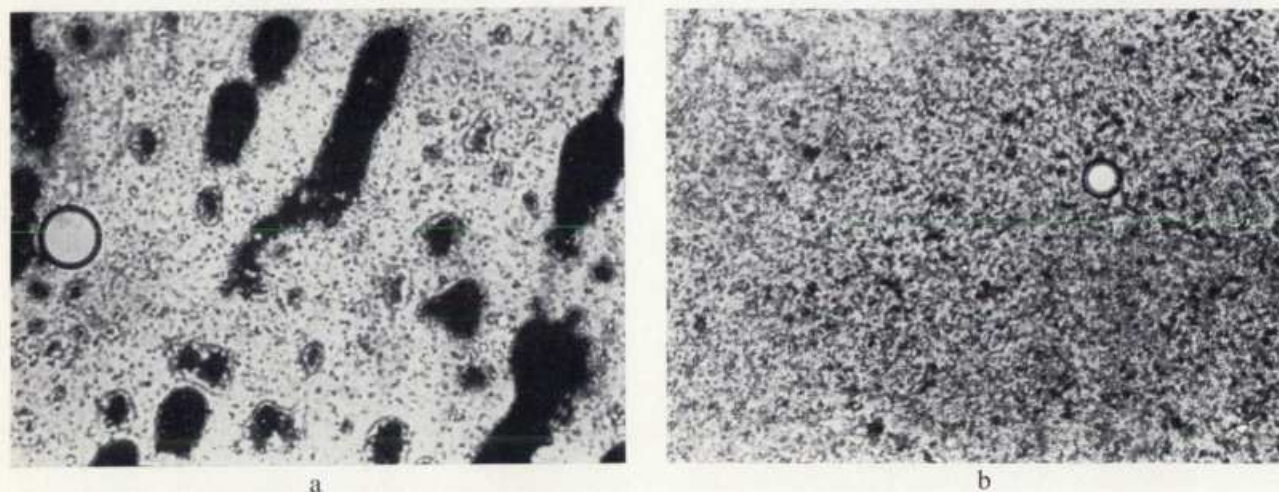


Fig. 4. Microfoto's van een mengsel van een emulsie van DDT en een suspensie van zineb. Vergroting  $110\times$ .

- a) Zonder toevoeging van een colloïde zijn de dispersies onverenigbaar. Er is een verregaande coalescentie van de emulsie en de suspensie is grotendeels uitgevlokt. De samengeklonterde vaste deeltjes uit de suspensie worden geheel ingesloten in olie van de emulsie. (Het ronde schijfje links op de foto is een bij toeval ingesloten luchtbel.)  
b) Met toevoeging van een colloïde is het mengsel zeer stabiel, zowel de olie als de vaste deeltjes blijven fijn gedispergeerd. (Het ronde schijfje is weer een luchtbel.)

belangrijke mate kunnen beïnvloeden voordat de druppels op het gewas zijn gedeponneerd. Zoals hierboven al is aangestipt, staan de druppels door hun geringe valsnelheid en sterke turbulentie sterk aan verdamping bloot, zodat ze tijdens de val steeds kleiner worden en door de wind soms kilometers ver worden meegevoerd. Voor het verminderen van deze sproei-

drift zijn twee maatregelen nodig. Ten eerste moet men over sproeitechnieken beschikken waarbij geen kleine druppels ontstaan. Druppels met een diameter van  $50\text{ }\mu\text{m}$  zijn reeds te klein; ze zijn in het algemeen niet meer op het object deponneerbaar. Ten tweede moet men proberen de verdamping van de vallende waterdruppels tegen te gaan. Neemt men hiertegen geen

maatregelen, dan zijn bij sproeien vanuit de lucht b.v. bij een temperatuur van 30 °C en een geringe luchtvochtigheid zelfs druppels van 100 à 150 µm niet meer deponeerbaar. De druppels mogen uiteraard ook weer niet te groot zijn. In het algemeen ligt de grens ongeveer bij een diameter van 500 µm; als ze groter zijn wordt het aantal per oppervlakte-eenheid op het object in bepaalde gevallen te gering, waardoor het effect van de bestrijding vermindert. Uiteraard is deze grens sterk afhankelijk van de actieve stof die wordt versproeid. Zo geven bij een dosering van 40 l/ha druppels van 500 µm een dichtheid van 6 stuks per cm<sup>2</sup> op het gewas; voor systemisch werkende pesticiden (d.w.z. pesticiden die in de sapstroom van de plant worden opgenomen) kan het voldoende zijn, maar voor fungiciden, die doorgaans niet systemisch werken, is dit volkomen ontoereikend.

Kort geleden heeft men sproeimondstukken (nozzles) geconstrueerd die druppels geven met een zeer smalle verdeling van de druppelgrootte. Hiermee heeft men reeds met succes onverdund „Malathion” verneveld bij een dosering van slechts één liter per ha. Overigens mogen we hieruit niet concluderen dat met deze methode de problemen van het vernevelen van geconcentreerde vloeistoffen zijn opgelost. „Malathion” is nl. veel viskeuzer en ook veel minder vluchtig dan water, en bovendien is een goede deponeerbaarheid van de druppels alleen bij weinig wind te bereiken. Deze eis kan men in de praktijk niet stellen; men zal dus meestal met grotere druppels moeten sproeien en dus met oplossingen of dispersies van de actieve stof.

Wat de verdamping van de druppels betreft, is water in feite een ongunstig verdunningsmiddel voor oplossingen en dispersies. Het heeft nl. een vrij hoge dampspanning; zo zal b.v. een waterdruppel met een diameter van 50 µm bij een omgevingstemperatuur van ca. 20 °C en een relatieve luchtvochtigheid van ca. 40% binnen vier seconden verdampen. Bij een diameter van 100 µm duurt dit 16 s (de verdampingsnelheid is ruwweg omgekeerd evenredig met het kwadraat van de diameter). Ondanks deze ongunstige eigenschap wordt water in belangrijke mate als verdunningsmiddel gebruikt omdat het goedkoop is en notoer onschadelijk. Al sinds enkele jaren wordt geprobeerd door het toevoegen van speciale hulpstoffen aan de dispersie de verdamping van de waterdruppels te verminderen.

#### *Hulpstoffen ter vermindering van de verdamping*

De verdamping van water kan worden tegengegaan door aan het water een stof toe te voegen die het wateroppervlak bedekt met een dichte laag moleculen, zodat het water wordt afgesloten van de lucht. Er zijn

goede resultaten bereikt met stoffen, zoals b.v. cetylalcohol, die uit een polaire groep (in dit geval een hydroxylgroep) en een lange apolaire koolwaterstofketen bestaan. Dank zij de sterke spreiding van deze stof op het wateroppervlak ontstaat er een dunne laag van dicht opeengepakte moleculen. Van elk molecuul is daarbij de hydroxylgroep naar het wateroppervlak gericht, terwijl de koolwaterstofgroep ervan is afgewend. Dit principe wordt toegepast om stilstaand water, b.v. in drinkwaterreservoirs, te conserveren, dat wil zeggen tegen extreme verdamping te vrijwaren.

Men zou kunnen proberen volgens hetzelfde principe de verdamping van versproeide druppels tegen te gaan. Het is echter niet eenvoudig om de verdampingsremmende stof zodanig in het preparaat te verwerken dat de druppels na het sproeien snel en voldoende dicht met een laagje van de stof zijn bedekt. Men kan deze stoffen wel in een zeer fijn verdeelde vorm in de suspensie of emulsie laten vrijkomen, maar een snelle opeenhoping aan het oppervlak van de waterdruppel is moeilijk realiseerbaar. Sommige andere stoffen die genoemd effect vertonen, b.v. verzadigde vetzuren zoals stearinezuur, kunnen helemaal niet worden gebruikt, omdat ze niet voldoende oplosbaar zijn in water dan wel een te geringe spreiding op water vertonen.

Enige jaren geleden zijn er door Hartley proeven genomen met bepaalde zouten van stearinezuur (in het bijzonder methyldibutylaminestearaat) die wel goed oplosbaar zijn in water<sup>[3]</sup>. Deze preparaten werden geïntroduceerd als verdampingsremmende hulpstoffen die uitsluitend met suspensies van fijn verdeelde pesticiden dienden te worden gebruikt. Hierbij mochten geen bevochtigers en dispergeermiddelen worden toegepast, aangezien de stearaten zelf oppervlak-actief zijn en een overmaat aan dit soort stoffen de werking van het steeraat zou verminderen. Deze werking berust op een splitsing van het steeraat in stearinezuur en een vluchtige base. De base verdampt uit de druppel en het stearinezuur zou zich nu, als gevolg van zijn moeilijke oplosbaarheid in water, aan het oppervlak van de druppels moeten ophopen.

In proeven met een suspensie van koperoxychloride is inderdaad een verminderde verdamping geconstateerd, maar of dit werkelijk aan het beschreven effect is toe te schrijven, is nog een open vraag. Het is nl. bekend dat oppervlaklaagjes van vaste stoffen op water gevoelig zijn voor de „stripeffecten” van wind, waardoor plaatselijk een meer of minder onbedekt

[3] G. S. Hartley en R. H. Howes, Special formulations for low volume spraying, Proc. 1st Brit. Insecticide and Fungicide Conf., Brighton 1961, blz. 533-546.

oppervlak wordt gevormd waar het water wel kan verdampen. Men kan verwachten dat dit effect bij sproeidruppels ook optreedt. Bovendien is het waarschijnlijk dat het vrijgemaakte stearinezuur door het nog intact zijnde steeraat in de sproeidruppel gedispergeerd (gesolubiliseerd) wordt gehouden, zodat het niet direct het oppervlak kan bereiken. Mogelijk moet de oorzaak van de verminderde verdamping gezocht worden in de viscositeitsverhogende werking van de stearaten: deze brengt immers mee dat de beweeglijkheid van de watermoleculen in de vloeistof geringer is, zodat er minder verdamping optreedt.

#### *Hulpstoffen ter verhoging van de viscositeit*

De sproeidrift kan ook aanzienlijk worden vermindert door met behulp van bepaalde stoffen de viscositeit van de sproeivloeistof te verhogen. We hebben hierboven al gewezen op de verminderde verdamping die hiervan het gevolg is, maar belangrijker is nog dat een meer viskeuze vloeistof grovere druppels vormt bij het vernevelen en dat dienovereenkomstig het percentage fijne druppels lager wordt. Reeds vele jaren geleden zijn in Frankrijk pogingen gedaan om op deze wijze de deponeerbaarheid te verbeteren; sinds kort is men nu in de V.S. bezig aan een grootscheeps onderzoek van deze invloed van de viscositeit, speciaal ten behoeve van het vernevelen van herbiciden. Dit laatste heeft in de V.S. veel belangstelling, omdat in verschillende Amerikaanse staten het sproeien van herbiciden vanuit de lucht geheel verboden is geweest wegens de grote schade die door sproeidrift was aangericht.

De versproeide druppels mogen ook weer niet te groot worden. Ze kunnen dan nl. door de sterke turbulentie die bij het sproeien optreedt, gedisintegreerd worden zodat er toch weer kleine druppels ontstaan. Behalve de viscositeit is ook van groot belang of de vloeistof „visco-elastische” eigenschappen heeft, d.w.z. dat de druppels de neiging vertonen zich samen te trekken zodat ze minder snel uiteen zullen spatten.

Er zijn onlangs goede resultaten bereikt met het vernevelen van bepaalde herbiciden (oplossingen van trichloorazijnzuur en emulsies van trichloorfenoxazijnzure esters) waaraan hoogmoleculaire cellulosederivaten (in de vorm van een colloïde) waren toegevoegd. Bij vernevelen vanuit de lucht bleek een concentratie van 0,75% hydroxyethylcellulose in de sproeivloeistof voldoende te zijn om sproeidrift te elimineren. Het gebruik van een dergelijk colloïde heeft bij het vernevelen van dispersies nog het bijkomende voordeel dat deze stoffen een dispersie stabiliseren. Dit geldt, zoals hierboven is besproken, vooral voor mengsels van emulsies en suspensies.

Indien we alleen het vernevelen en deponeren van de

vloeistof beschouwen, zijn de cellulosederivaten dus heel goede middelen om de sproeidrift te verminderen: men kan, door de concentratie te variëren, de viscositeit binnen ruime grenzen aan elk sproei- of nevelapparaat aanpassen. Beschouwen we echter het totale effect van de bestrijding, dan blijkt ook bij deze methode de bruikbaarheid weer beperkt te zijn. Ten eerste moet rekening worden gehouden met de voorwaarden voor het pesticide ten aanzien van de bedekkingsdichtheid van het gewas met sproeidruppels. Bij een systemisch herbicide zal de geringe dichtheid die bij het sproeien met grote druppels optreedt, geen bezwaar zijn, bij een fungicide, dat zoals al eerder is vermeld, een uiterst dichte bedekking met fijne druppels vergt, zal om deze reden enige sproeidrift getoleerd moeten worden. Een tweede bezwaar van de methode treedt op nadat de druppels op het gewas zijn beland. De actieve stof moet dan snel uit de druppels vrijkomen en op de plant worden overgedragen. Terwijl nu een hoge viscositeit bij het vernevelen zeer gunstig werkt, is deze voor het vrijkomen van de actieve stof een groot beletsel. Hiervoor zouden de druppels nl. snel moeten vervloeien, en dit gebeurt als gevolg van de hoge viscositeit niet. De druppel blijft op het blad liggen, er verdampt water uit, hierdoor neemt de viscositeit in de druppel nog meer toe, en het gevaar bestaat nu dat de actieve stof zodanig wordt ingekapseld dat zijn werking wordt belemmerd. Gelukkig zijn niet alle actieve stoffen hiervoor gevoelig, maar pesticiden die sterk vetachtig zijn en die moeilijk in water oplossen of slecht door films van hydrofiele colloïden (zoals deze cellulosederivaten) diffunderen, zijn klaarblijkelijk niet geschikt om met deze stoffen te worden verneveld.

Men zou graag willen hebben dat de viscositeit tijdens het sproeien hoog is, en direct na het deponeren laag. Dit kan niet worden verkregen door het toevoegen van een verdikkingsmiddel. Er zijn echter wel systemen mogelijk die deze eigenschap vertonen, en wel bepaalde instabiele dispersies waarvan de viscositeit wordt bepaald door een gedispergeerde stof. Als deze stof na het deponeren coalesceert, kan de gewenste viscositeitsverandering optreden. Een dergelijk systeem vindt men b.v. in de invert-emulsies.

#### **Invert-emulsies**

Emulsies van het type water-in-olie (invert-emulsies) zijn bij de bespreking van de gebruikelijke olie-in-water-emulsies reeds even genoemd als een ongewenst verschijnsel dat bij geconcentreerde emulsies kan optreden. Men kan deze emulsies echter ook doelbewust bereiden door middel van bepaalde sterk lipofiele emulgatorenmengsels<sup>[4]</sup>. De viscositeit van een invert-emulsie vertoont nl. een aspect dat gunstig is voor het

gebruik als sproeivloeistof: de viscositeit van de invert-emulsie is doorgaans veel hoger dan die van de samenstellende fazen, zodat na het breken van de emulsie de viscositeit aanzienlijk daalt. Om deze reden hebben de invert-emulsies sinds enkele jaren veel aandacht gekregen voor het vernevelen vanuit vliegtuigen en helikopters, in het bijzonder van herbiciden.

Bij een invert-emulsie zijn waterdruppels geëmulgeerd in een continue oliefaze. Het blijkt mogelijk te zijn een dergelijke emulsie toe te passen ook als de hoeveelheid water groter is dan de hoeveelheid olie. Er ontstaat dan een systeem waarin grote aantallen waterdruppels worden gescheiden door dunne wanden van olie die toch alle samenhangen (zie fig. 5). De viscositeit van deze emulsie wordt bepaald door de wrijving aan de grensvlakken van olie en water. Indien er nu meer water in de olie wordt verwerkt, of indien het water er fijner in wordt geëmulgeerd, neemt de totale oppervlakte van de grensvlakken toe. Dit is de oorzaak van het verrassende gedrag van deze emulsies: de viscositeit neemt toe naarmate er meer water in de olie is geëmulgeerd en naarmate het water er sterker doorheen is geroerd. (Een soortgelijke situatie treedt b.v. ook op bij slagroom, die stijver wordt naarmate er meer lucht in is geklopt!) Gaat men door met het toevoegen van water, dan breekt de emulsie (zie fig. 6), waarna de olie als een laag boven op het water ligt.

Hoewel de hoge viscositeit op zichzelf gunstig kan zijn, stelt een te hoge waarde hiervan grenzen aan de toepasbaarheid. Reeds bij een verhouding 3 à 4 volumedelen water op 1 deel olie is de viscositeit nl. vrij hoog, en bij een nog grotere hoeveelheid water is de emulsie nauwelijks nog spuitbaar. Dit betekent dat bij het sproeien de emulsie niet veel water kan bevatten, zodat dus over een bepaald areaal een relatief kleine hoeveelheid van een vrij dikke vloeistof moet worden versproeid, wat hoge eisen stelt aan de sproeiapparaten. Van vele pesticiden is reeds een hoeveelheid van 1 liter per ha voldoende voor de bestrijding. Zo is b.v. van het herbicide 2, 4, 5-trichloorfenoxyzijnzure butylester 2 liter van een 50%-oplossing in dieselolie genoeg om onkruiden te verdelgen op 1 ha. In dit geval zou een invert-emulsie met 6 à 8 liter water bij deze 2 liter olie nog juist verspuitbaar zijn, zodat dus in het gunstigste geval 10 liter vloeistof moet worden verspreid over 1 ha. Weliswaar kan men de viscositeit van een invert-emulsie weer verlagen en de hoeveelheid vergroten door de emulsie met b.v. dieselolie te verdunnen, maar dit kan in economische en in biologische zin bezwaren opleveren. Teveel olie kan nl. het gewas „verbranden” waardoor systemische pesticiden niet ongehinderd in de planten kunnen worden opgenomen zodat ze niet optimaal tot activiteit kunnen komen.

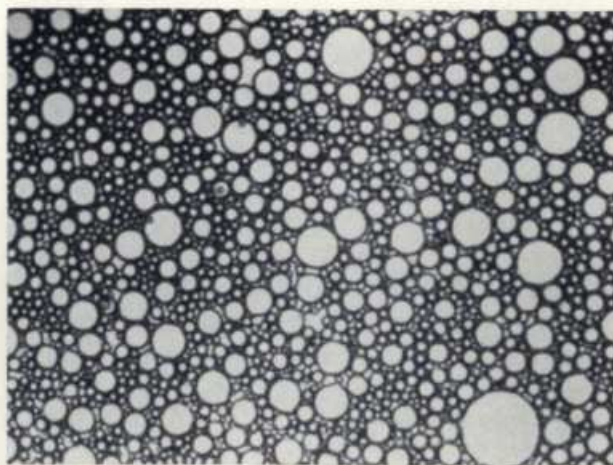


Fig. 5. Microfoto van een stabiele water-in-olie-emulsie. De witte cirkeltjes zijn waterdruppels die van elkaar zijn gescheiden door dunne laagjes olie. Vergroting 330 $\times$ .

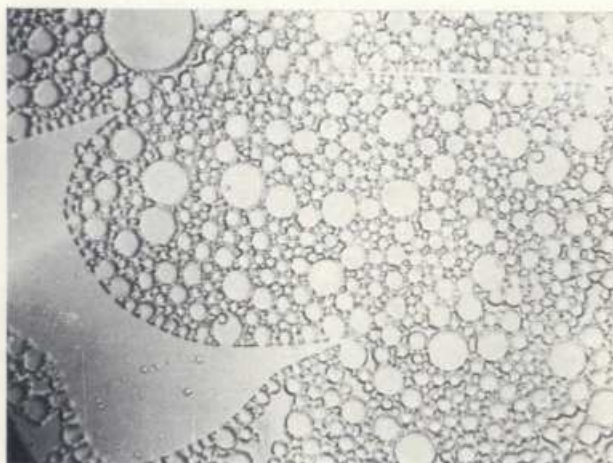


Fig. 6. Microfoto van een water-in-olie-emulsie waaraan zoveel water is toegevoegd dat de emulsie begint te breken. Het water is op de foto wit weergegeven. Duidelijk is te zien dat de oliefaze zich begint samen te trekken en zich losmaakt van de waterfaze. Vergroting 400 $\times$ .

Zolang er geen sproeitechnieken zijn ontwikkeld waarmee betrekkelijk dikke vloeistoffen kunnen worden verspreid, blijft de toepassing van invert-emulsies voorlopig beperkt tot die pesticiden waarvoor een „volledig” bedekken van de planten niet nodig is. Voor systemische stoffen zou de methode dus bruikbaar kunnen zijn.

In de U.S.A. is Stull Chemical Co. erin geslaagd om met een speciaal sproeimondstuk toch meer water met de invert-emulsies te versproeien. De olie en het water worden hierbij elk apart onder druk naar het

[4] J. P. Colthurst, R. E. Ford, C. G. L. Furmidge en A. J. A. Pearson, Water-in-oil emulsions and the control of spray drift, The formulation of pesticides, S.C.I. Monograph No. 21, 47-60, 1966.

sproeimondstuk toegevoerd en daar in een zo intensieve turbulentie gebracht dat spontaan een water-in-olie-emulsie ontstaat. Op deze wijze schijnt per volume-deel olie 10 tot 13 delen water te kunnen worden toegevoegd<sup>[4]</sup>. Doordat de emulsie pas in het mondstuk ontstaat, treedt in het systeem geen hoge druk of weerstand op. Het is echter duidelijk dat deze techniek zeer actieve emulgatoren vergt, die dus ook sterk stabiliserend zullen werken op de emulsie.

Het zal de lezer van dit artikel duidelijk zijn geworden dat er voor het vernevelen van geconcentreerde dispersies op het ogenblik nog geen methode is aan te geven die bij *elk* pesticide uitkomst biedt. Het is in dit stadium ook heel moeilijk te voorspellen in welke

richting de ontwikkeling zal gaan. Zeker is dat een verdere verfijning van de sproeitechnieken hierbij van groot belang zal zijn; we noemden de sproeimondstukken waarmee onverdund „Malathion” werd verspoten. Mogelijk zal dit voor stoffen waarbij enige sproeidrift niet zo bezwaarlijk is, de beste oplossing blijken te zijn. Voor vele stoffen zal echter het onderzoek naar methodes om sproeidrift te voorkomen, moeten voortgaan. Gezien het grote aantal verschillende pesticiden en de verschillende wijzen waarop ze hun werking uitoefenen, is het niet waarschijnlijk dat er een algemene methode gevonden zal worden; voor elke stof zal weer door een uitgebreid onderzoek de beste methode moeten worden uitgezocht.

---

**Samenvatting.** De chemische bestrijdingsmiddelen (pesticiden) die in de land- en tuinbouw worden gebruikt, worden merendeels toegepast in de vorm van een emulsie of suspensie in water. Een bezwaar is hierbij dat met de conventionele sproeiapparatuur een gelijkmatige verdeling van de sproeidruppels over het gewas alleen is te bereiken indien de vloeistof sterk is verdund. Men wil nu, vooral bij sproeien vanuit vliegtuigen met hun beperkte laadcapaciteit, bij voorkeur geconcentreerde vloeistoffen verspreiden. De verschillende methodes hiervoor en de fysische en colloïdchemische problemen die erbij optreden, worden hier behandeld. Van belang is vooral het vermijden van „sproeidrift” — het wegwaaien van de druppels. Dit kan men vooral tegengaan door te zorgen dat geen kleine druppels in het sproeimondstuk ontstaan, en door te zorgen dat de druppels tijdens de val niet

door verdamping veel kleiner worden. In het artikel worden eerst de geconcentreerde emulsies en suspensies behandeld en de problemen die optreden indien men deze twee typen dispersies tegelijk wil vernevelen. Daarna worden enkele hulpstoffen besproken die de verdamping van de druppels verminderen, en voorts hulpstoffen die de viscositeit verhogen waardoor de gespreide druppels groter zijn. Bij al deze methodes om sproeidrift te voorkomen kunnen weer nadelen optreden, b.v. het verminderen van de pesticide werking doordat de actieve stof niet goed vrijkomt uit de druppel na het deponeren. Ten slotte worden de zg. invert-emulsies besproken (water-in-olie-emulsies), die enkele eigenschappen vertonen waardoor ze misschien van nut kunnen zijn voor het vernevelen van bepaalde geconcentreerde pesticiden.



Pierpont Morgan Library, New York

## Het bestrijden van ziekten en plagen in de landbouw in het verleden

R. van der Veen

Zolang de mens zich met de landbouw beziggehouden heeft, zolang bestaan er ziekten en plagen in de landbouw.

Een aanplant van voedingsgewassen vormt een kostbaar bezit; dit bezit moest verdedigd worden tegen belagers, een misoogst betekende vaak hongersnood. Het is dan ook niet te verwonderen dat reeds in zeer oude geschriften iets over de bestrijding van ziekten en plagen te vinden is.

Als men tegenwoordig spreekt over deze bestrijding, dan wordt in het algemeen gedacht aan chemische middelen, zoals insecticiden, fungiciden, aan „repellents”, aan lokstoffen gemengd met vergif, en derg. En wil men nog moderner lijken, dan praat men over biologische bestrijding, waarbij dan wel eens wordt voorgesteld dat dit wel de uiteindelijke oplossing zal geven.

Uit de studie van de geschiedenis der landbouwplagen — waarover in de laatste tientallen jaren enkele overzichten zijn verschenen <sup>[1]</sup> — blijkt dat genoemde moderne richtlijnen helemaal niet zo modern zijn. Er is ook hier weer niets nieuws onder de zon. We kunnen alleen zeggen dat de oude methodes thans meer geperfectioneerd zijn en op grotere schaal worden toegepast. Maar het aantal mensen is dan ook zoveel groter.

De oudste landbouwgebieden waar we iets van weten, zijn Egypte, het Midden-Oosten en China. Uit al deze gebieden zijn gegevens bekend over misoogsten, over plagen die de misoogsten veroorzaakten en over de bestrijding daarvan. De belangrijkste plagen waren blijkbaar sprinkhanen, ratten en muizen, terwijl bijna 2000 jaren vóór onze jaartelling de schimmel die „brand” in het koren veroorzaakt, in het oude Babylon zoveel schade tot gevolg had dat men deze ziekte met een toverformule te lijf ging. Nog steeds behoren sprinkhanen, ratten en muizen tot de grote plagen, die alle aandacht vragen, de brandschimmel was tot in de 19de eeuw nog steeds de oorzaak van een van de ernstigste ziekten in het graan.

Voorraadinsekten moeten in de oude tijden zeker ook een grote rol gespeeld hebben. In een goed afgesloten Egyptische vaas en in het graf van Toet-Anch-Amen zijn resten van de tegenwoordig nog steeds zo schadelijke *Lasioderma serricorne* en *Tribolium castaneum* gevonden. Onder Ramses II werden in Egypte reeds voortreffelijke graansilo's gebouwd, die niet alleen geschikt geweest moeten zijn om rotting tegen te gaan maar ook om het graan te beschermen tegen voorraadinsekten.

De sprinkhanen waren blijkbaar, toen evenals in

Prof. dr. R. van der Veen, hoogleraar in de Botanie aan de Universiteit Utrecht.

De titelfoto is een reproductie uit een Perzisch manuscript van Baktishu, geschreven omstreeks 1295.

<sup>[1]</sup> We noemen hier slechts twee heel recente: H. Braun, *Geschichte der Phytomedizin*, uitg. Parey, Berlijn 1965. K. Mayer, *4500 Jahre Pflanzenschutz*, uitg. Ulmer, Stuttgart 1959.



Fig. 2. Deel van een fresco aan de dom van Graz, geschilderd in 1480 door Thomas von Villach. In dit deel zijn de drie grote „Landplagen” voorgesteld: links de sprinkhanen, rechts de pest, in het midden de Turken (Graz lag zowat in de voorste frontlijn in de eeuwenlange afweerstrijd tegen Turkse invallen). Het sprinkhanenbeeld is hiernaast vergroot weergegeven. (Gereproduceerd met toestemming van het Dompfarramt te Graz, vanaf een geresatureerde kopie; het origineel is in slechte staat. De lijntekening is overgenomen uit E. Schimitschek, Anzeiger für Schädlingkunde 26, No. 1, 42-44, 1953.)

later tijden (zie hieronder), het meest gevreesd. Meermalen worden zij genoemd in het oude Egypte; omstreeks 700 v. Chr. lieten de Assyrische vorsten Sargon II, Sanherib en ook Assurbanipal de jaren waarin sprinkhanen grote schade hadden aangericht door inscripties memoreren; de Chinese keizer Chen Tsun gaf in ca. 1075 v. Chr. een decreet uit waarbij de grondbezitters en dorpschoudeu verplicht werden om te zorgen voor het verzamelen en vernietigen van eieren en het vangen en vernietigen van volwassen sprinkhanen, op straffe van 100-120 stokslagen bij in gebreke blijven.

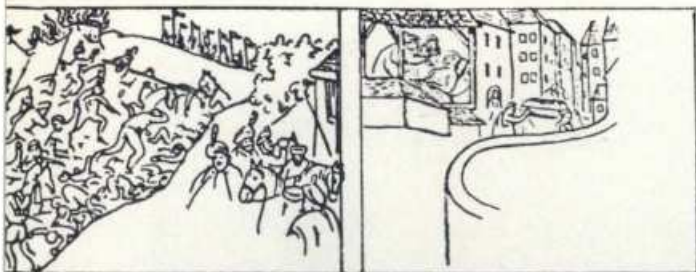
Hoe ernstig de bedreiging van de oogst door insecten toen opgevat werd, blijkt uit een redevoering van minister Jao Tschung, die in 714 v. Chr. iedereen oproept om mede te werken aan de bestrijding van insecten omdat dit de redding van de mensheid betekent. Het doet denken aan een uitspraak in recente tijd van een der presidenten van Brazilië, die opriep tot de meest intensieve bestrijding van de parasolmieren (Atta's), daar het in deze strijd erom ging of Brazilië voortaan voor de Brazilianen of voor de parasolmieren zou zijn.

Hoewel men de indruk krijgt dat de insectenbestrijding grotendeels met de hand geschiedde, kende men toen in China toch reeds lang een soort chemische bestrijding. In ca. 1200 v. Chr. gebruikte men daar kalk en houtas tegen voorraadinsecten en werden zaden vóór het planten met plantaardige insecticiden tegen vraat beschermd. Ook gebruikte men in China reeds vóór onze jaartelling het arseen als insecticide.

In de Griekse literatuur worden ook enkele voorbeelden van chemische bestrijding genoemd. Zo vermeldt Homerus de therapeutische werking van zwavel. Aristoteles beveelt verschillende rookmiddelen aan, waaronder zwavel, ter bestrijding van ziekten en plagen in de landbouw. Democritus van Abdera vermeldt het behandelen van zaad met aftreksel van Aizoon (in dit geval waarschijnlijk muurpeper: *Sedum acre*). Hier zijn het kennelijk de looistoffen die de nodige bescherming moeten geven.

In het Romeinse rijk worden wat later lijmringen aan vruchtbomen toegepast; als lijm wordt gebruikt een mengsel van olie en bitumen.

In de allereerste eeuw van onze jaartelling geeft Cajus Plinius Secundus verschillende aanwijzingen



voor chemische bestrijdingswijzen; o.a. noemt hij voor bestrijding van insecten het arseentrioxide. Hij merkt daarbij iets op dat tegenwoordig nog evenzeer geldt, nl. dat men vooral moet verhoeden dat de kuur zelf een ziekte veroorzaakt, hetgeen gebeuren kan als men het middel te vaak of op het verkeerde tijdstip toepast.

Uit het voorgaande is wel duidelijk dat een bestrijdingswijze, alleen omdat zij chemisch is, de naam van „modern” beslist nog niet mag dragen. Men zou met evenveel recht van „klassiek” kunnen spreken; het zijn alleen de spuit- en stuiftechnieken die sterk verbeterd zijn. Bovendien is het aantal middelen sterk uitgebreid, al zijn verschillende van de oude middelen, zoals zwavel en arseen, nog steeds in gebruik.

Hoe staat het nu met de nog moderner klinkende „biologische” bestrijdingsmethodes? Daar vinden we veel minder over in de oude geschriften. Toch ontbreekt dit element niet geheel. Hiervoor moeten we weer naar China, in dit geval Cochinchina, teruggaan. Er wordt daar nl. omstreeks het jaar 300 vermeld dat mieren in strozakken worden verzameld en op de markten worden verkocht met de bedoeling deze zakken in de mandarijnenbomen op te hangen. Deze mieren vernietigden op die bomen dan de wanten en vele andere schadelijke insecten.

Merkwaardig genoeg vinden we een bijna identiek advies terug in 1579 bij de Engelsman Lupton<sup>[2]</sup>, die schrijft: „Indien men rupsen vernietigen wil, dan besmere men een boom rondom goed met teer, verzamele een soort grote mieren in een doek, welke men dan aan de boom ophangt. De mieren kunnen de boom niet verlaten ten gevolge van het teer en moeten dus op de boom naar voedsel zoeken en zullen zo alle rupsen vernietigen zonder een enkele vrucht te beschadigen” (fig. 1).

Dit zijn dus twee zeer duidelijke voorbeelden van biologische bestrijding in vroeger jaren.

Het gebruik van „repellents” is ook niet nieuw. K. Mayer vermeldt dat in een papyrusrol uit Egypte reeds

<sup>[2]</sup> Thomas Lupton, A thousand notable things of sundry sortes. Wherof some are wonderfull, some strange, some pleasant, diuers necessary, a great sort profitable and many very precious, Londen 1579, blz. 282.

<sup>[3]</sup> Zie het aangehaalde boek van H. Braun, blz. 25.

in ca. 1550 v. Chr. geschreven wordt over een behandeling van wanden en vloeren van graanopslagplaatsen met een middel dat muizen afschrikt.

Heel veel later beschrijft Glauber (1604-1670) een Wild-Afweer-Middel, dat veel overeenkomst heeft met het W.A.M. dat men thans nog bij Philips-Duphar kan krijgen. Hij schrijft erover: „Von den Haaren oder Hörnern der Thieren wird auch ein Spiritus gemacht, welcher aber sehr übel stinckt”. Als men lompen hierin drenkt en deze dan om een stuk grond heen ophangt, „so geht kein Hirsch oder wild Schwein hinein Schaden zu tun; denn sie fürchten sich für den Geruch, welchen sie weit riechen, und vermeynen, es sey ein Jäger bey der Hand, von welchem sie geschossen möchten werden”<sup>[3]</sup>. Het geeft te denken over de lucht die jagers vroeger bij zich droegen.

In het zich ontwikkelende Europa kwam men gedurende lange tijd met de kunst van de praktische bestrijding van ziekten en plagen niet verder. Men beschouwde misoogsten en insectenplagen als straffen Gods, en men stelde ze als zodanig op één lijn met de Zwarte Dood (de pest) en met de invallen van de Turken (fig. 2). Men moest dus trachten de plaag der insecten evenals de andere landplagen door gebeden te keren. Het idee van de bestraffing door een sprinkhanenplaag heeft iconografisch vaste vorm gekregen

## 282

*The tenth Booke*

you haue done with it, fo: so it fastneth and byndeth the stronger: and in such so: that it fastneth perces of glasse togethet.

51 If you woulde destroye Caterpyllers, do thus. Anoynt all the bottom of the tree round about with Tarre, then get a great so: of Antes or Dysmeyes, and put them in some bagge, and drawe the same by by a corde into the tree, and so let it hang there, so that it touch the body of the tree, and the Antes letted to go downe from the tree by the meanes of the Tar, wyl (fo: want of foode) eate and destroye all the Caterpyllers there, without hurting any of the fruite. This was tolde me fo: a very truely.

52 Make a hoale in the ende of a Goose egge, and put all the whyte and polke out of it, then put into the shell, a Backe that flies about in the evening, and then glew or close it fast on the toppe, and you shal see the Backe flye away with the same Egge shell: to the great maruayle of them that knowes it not.

53 It is verye euyl (fo: them that fall's syck:) when the Moone is applying in conjunction to the Sun, and woofe, when she is within syxe degrees of the Sunne. This I knowe to be true by often prooffe and

British Museum, Londen

Fig. 1. Bladzijde uit het boek van Lupton (1579)<sup>[2]</sup>, met in punt 51 de beschrijving van een biologische bestrijding van rupsen (caterpillars).



Fig. 3. Een der panelen van het Barbara-altaar van Meester Francke (Hamburg, ca. 1420), uit de kerk te Kalanti-Nykyrko. Voorgesteld is een scène uit de Barbara-legende: de schapen van een der beide herders worden in reusachtige sprinkhanen veranderd, als straf ervoor dat hij de schuilplaats van de H. Barbara aan haar vader aanwijst [4]. (Gereproduceerd met toestemming van het Nationaal Museum te Helsinki, waar het altaar zich thans bevindt.)

in de Barbara-legende: de verraderlijke herder die de schuilplaats van de H. Barbara aan haar woedende vader aanwijst, ziet tot straf zijn kudde schapen in een zwerm reusachtige sprinkhanen veranderd. Op diverse altaarpanelen uit de Middeleeuwen komt men deze scène tegen (fig. 3).

Niet voor niets concentreerde zich de beeldende fantasie op de sprinkhanen: hun optreden gaf de

— een scène die we weer herhaaldelijk in kerk en klooster afgebeeld vinden (fig. 5). De heilige Bernhard sprak de banvloek uit over de muggen in 921, waarop deze bij hopen op de grond vielen. De bisschop van Lausanne, in vol ornaat, vervloekte de meikevers (fig. 6), de pastoor van Kalteren de sprinkhanen.

Later worden zelfs vele kerkelijke en nog later ook wereldlijke processen gevoerd tegen de schadelijke



Collectie Wick, Zentralbibliothek Zürich

Fig. 4. Vlugschrift uit 1556 met afbeelding naar de natuur van sprinkhanen. Uit deze tekening blijkt wel hoe geladen de stemming tegenover de sprinkhanen was. Ze vernielden in die tijd meermalen de oogst in gedeelten van Europa; zo was er b.v. in 1538 in Roemenië een grote hongersnood door deze insecten veroorzaakt.

grootste ellende, en in vlugschriften — die toen, als houtsneden gedrukt, de plaats van onze nieuwsbladen innamen — zien we dit dier herhaaldelijk op zijn afzichtelijkst voorgesteld (fig. 4).

Het bestrijden van plagen door boete en gebed was natuurlijk weer niets nieuws, want ook andere en oudere godsdiensten dan het Christendom kenden hun riten, offers en gebeden voor een goede oogst. Daar het maatschappelijk leven in Europa in al zijn aspecten zo lang en zo volledig bepaald werd door de invloed van de geestelijkheid, brachten de eerste 1600 jaren van onze jaartelling er niet veel anders dan de hongersnoden te accepteren als straf en te bidden voor goede oogsten. De exponenten van deze houding werden de schutpatronen, die de boer moesten beschermen tegen schadelijk gedierte. De eerste hiervan is St.-Magnus, abt van Füssen, die in 666 met de staf van St.-Columbanus een naderende sprinkhanenzwerm afweert

dieren. In 1320 vond een proces plaats voor het geestelijk gerecht van Avignon tegen de meikevers. De meikevers werden gedaagd, met de bedreiging van de banvloek der Kerk bij niet verschijnen. Zij hadden een verdediger toegewezen gekregen en deze eiste recht op voedsel voor de meikevers. Dit recht werd erkend en de meikevers kregen een stuk grond toegewezen waar voldoende voedsel aanwezig zou zijn. De meikevers werden veroordeeld om zich binnen drie dagen alle terug te trekken op dit omschreven terrein. De kevers die zich nog buiten het terrein bevonden waren vogelvrij.

In 1481 vond in Bazel een dergelijk proces plaats en

[4] B. de Gaiffier, Le triptyque du Maître de la légende de sainte Barbe, Rev. belge d'Arch. et d'Hist. de l'Art 28, 3-23, 1959. Hierin wordt de door Jan de Wackerzeel geboekstaafde versie van de legende besproken (die nauwkeurig gevolgd is op een triptiek waarvan gedeelten in Brussel en Brugge worden bewaard).



Fig. 5. De schutspatroon St.-Mang weert met de staf van St.-Columbanus een zwerm insecten, vermoedelijk meikevers en sprinkhanen, af. Plafondschildering in de kloosterkerk van Schussenried (Württemberg).

werd, ondanks de rechtsbijstand van de Freiburger Faculteit, de banvloek uitgesproken over de sprinkhanen. In 1585 was er een proces in Valence tegen rupsen, die veroordeeld werden het land te verlaten.

Het laatste kerkelijke dierenproces had plaats in 1733 in Baumantan in Frankrijk, het laatste wereldlijke dierenproces in 1830 in Denemarken.

Inmiddels begon de bestudering van de ziekten en plagen meer experimenteel te worden. De grote vlucht die de biologie in de 16de en 17de eeuw nam, o.a. door de toepassing van het microscoop, en die leidde tot het verschijnen van talrijke werken waarin de belangrijkste insecten (fig. 7) en talrijke micro-organismen werden besproken, bereidde de bodem voor de experimentele aanpak voor. Vooral Matthieu Tillet (1714-1791) leidde deze periode in. Hij bestudeerde speciaal de brandziekte in graan, een ziekte die enor-

me schade aan de korenvelden kon veroorzaken. In 1755 verscheen zijn „Dissertation sur la cause qui corrompt et noircit les grains de bled dans les épis; et sur les moyens de prévenir ces accidens” (fig. 8).

Na zorgvuldige waarnemingen kwam Tillet tot een aantal conclusies. Hij stelde proeven voor die haast aan de moderne eisen voor veldproeven voldeden. Hij voorspelde de resultaten, en tot veler verbazing kwamen al deze voorspellingen uit. Zo gaven gezonde korrels, vóór het planten bestoven met de zwarte sporen, een zeer zieke aanplant. Indien echter zulke korrels na bestuiving met sporen behandeld waren met salpeter-

zuur, ongebluste kalk of andere middelen, gaven zij een gezonde aanplant.

Nu begint een snelle opbloei van de bestudering der plantenziekten. De ontdekkingen volgen elkaar op.



Fig. 6. Bestrijding van plagen in de middeleeuwen: de bisschop van Lausanne vervloekt de meikevers. (Uit H. Braun <sup>[1]</sup>, blz. 14.)

Er verschijnen voorschriften voor desinfectie van zaad; zwavelkalk wordt aanbevolen voor vruchtbomen; Bordeauxse pap komt in gebruik; zwavelpoeder blijkt tegen echte meeldauw te werken.

Aan het einde der vorige eeuw zijn in vele landen centra gesticht voor bestrijding van ziekten en plagen. Men leert de veroorzakers kennen en vindt betere toepassingen voor de bestrijdingsmiddelen.

Grote rampen, veroorzaakt door een landbouwplaag, beginnen nu zeldzaam te worden. De laatste grote ramp, door een plantenziekte veroorzaakt, trad op in Ierland. Men had zich daar gespecialiseerd in de verbouw van aardappels. Toen tussen 1843 en 1845 een schimmel de aanplant massaal infecteerde, resulteerde dit in de ene misoogst na de andere, met als gevolg een grote hongersnood. Een groot deel van de bevolking emigreerde naar Amerika. De schimmel verbreidde zich ook over Europa. Nog steeds is deze aard-



Fig. 7. Titelbladzijde van S. Blankaert, Schouburg der Rupsen, Wormen, Maden en Vliegende Dierkens, Amsterdam 1688, een der overzichtswerken op het gebied van de entomologie uit de 17de eeuw.

# DISSERTATION SUR LA CAUSE QUI CORROMPT ET NOIRCIT LES GRAINS DE BLE DANS LES ÉPIS; ET SUR LES MOYENS DE PREVENIR CES ACCIDENS.

QUI A REMPORTÉ LE PRIX AU JUGEMENT DE  
l'Académie Royale des Belles-Lettres, Sciences & Arts de Bordeaux.

PAR Mr. TILLET, de Bordeaux, Directeur de la Monnoye de Troyes.



A BORDEAUX,

CHEZ la Veuve de PIERRE BRUN, Imprimeur Aggrégé de  
l'Académie Royale, rue Saint James.

M. DCC. LV.

AVEC PRIVILEGE DU ROI.

Fig. 8. Titelblad van de publikatie van Tillet, die van groot belang was voor de ontwikkeling van de experimentele bestudering der ziekten en plagen. (Uit H. Braun <sup>(1)</sup>, blz. 37.)

appelziekte een ernstige plaag. De aardappelverbouw op grote schaal is alleen mogelijk indien de aanplant vele malen met fungiciden bespoten wordt.

Veelal meent men dat pas na de laatste wereldoorlog de organische insecticiden en fungiciden hun intrede hebben gedaan. Dit is niet geheel juist; als eerste synthetisch organisch middel moet wellicht het dinitro-orthocresol genoemd worden, dat reeds in 1892 door de Elberfelder Farbenwerke ontwikkeld werd. Het werd in de handel gebracht voor het bestrijden van nonvinders onder de naam van „Antinonin”.

Pas veel later werd de insecticide werking van HCH ontdekt (1933) en nog later die van DDT (1939).

Intussen hadden de bestrijders van plagen echter wel een aantal andere organische bestrijdingsmiddelen in handen, die afkomstig waren uit planten. Reeds in 1690 beveelt La Quitinye tabaksaftreksel aan tegen wantsen. Veel later, in 1844, schijnt een afkooksel van tabaksblad vaak in wijngaarden gebruikt te zijn voor de bestrijding van insecten. Nog steeds is dit middel, dat nu geconcentreerd is en onder de naam van nicotine verkocht wordt, een veel gebruikt insecticide, ondanks zijn grote giftigheid.

In 1840 ontdekte Anna Rosauer de insecticide werking van Pyrethrum, dat spoedig daarna als Dalmatisch

insektenpoeder in de handel kwam. Waarschijnlijk kenden de bewoners van Klein-Azië en de Balkan deze werking al veel eerder. Het is nog steeds een belangrijk, snel werkend en voor ons niet giftig insecticide. Wegens de snelle werking (men spreekt van een „knock down” effect) en door de geringe toxiciteit voor mensen wordt het pyrethrin vaak in aerosols verwerkt. Na opheldering van de chemische structuur is men erin geslaagd enkele verwante stoffen met dezelfde werking, o.a. het „allethrin”, synthetisch te bereiden.

Weer later kwam de insektendodende werking van de Derriswortel te voorschijn, waarna gemalen wortels of rotonhoudende extracten toegepast werden.

Na de tweede wereldoorlog heeft vooral de groep van synthetische bestrijdingsmiddelen een grote vlucht genomen. Deze periode kan echter nog niet tot „de geschiedenis” gerekend worden en het is daarom hier niet de plaats om daarop in te gaan.

Toch mag één facet van de zo sterk uitgebreide chemische bestrijding nog wel genoemd worden. Daar een aantal van de thans toegepaste bestrijdingsmiddelen nogal toxisch zijn, ook voor mensen en voor het vee, heeft de overheid in praktisch alle landen deze bestrijding aan strakke banden gelegd. Het publiek begon zich soms angstig te maken over het feit dat een groot gedeelte van het dagelijks menu bespoten of bestoven is geweest met een of ander giftig middel.

Ook deze angst is niet nieuw. K. Mayer vermeldt dat in 1808 in Karlsruhe reeds een verordening tot stand kwam waarbij het verboden werd om giftige middelen als arseen en sublimaat te verhandelen als beschermingsmiddelen tegen insektschade, omdat ze door minder gevaarlijke preparaten vervangen konden

worden. De verkoop en het gebruik van de giftige middelen werden slechts toegestaan aan die kooplieden die een goede boekhouding ervan aanhielden en de voorgeschreven veiligheidsmaatregelen in acht namen. Het ligt voor de hand aan te nemen dat in die dagen met arseen en sublimaat wel eens ongelukken gebeurden — door boos opzet of ongewild, en de verordening was wellicht evenzeer bedoeld om de eerste tegen te gaan als de tweede.

Dat de controle door de overheid thans, door de grote uitbreiding van de bestrijdingsmiddelen, nog veel stringenter moest worden ligt voor de hand. Door deze controle wordt de veiligheid van de consument gegarandeerd; de keerzijde van de medaille is de remmende werking die zij op de ontwikkeling van nieuwe en betere bestrijdingsmiddelen uitoefent, doordat de invoering van zulke middelen slechts na zeer kostbare vooronderzoekingen betreffende de toxiciteit en andere nevenwerkingen mogelijk is.

---

**Samenvatting.** Uit de studie van de geschiedenis der landbouwplagen blijkt niet alleen dat deze al in de grijze Oudheid voorkwamen, maar ook dat behalve mechanische reeds zeer vroeg (zeker vóór 1000 v. Chr.) chemische bestrijdingsmiddelen werden toegepast. Zelfs een biologische bestrijding komt men reeds eeuwen geleden tegen. Godsdienstige invloed leidde in Europa tot in de 16de eeuw tot een meer lijdzame houding tegenover de plagen, waarbij men zijn hoop vestigde op de werking van boete en gebed of op het ingrijpen van schutspatronen, met de in onze ogen vermakelijke uitwas van kerkelijke (en wereldlijke) processen ter veroordeling van de in overtreding zijnde insecten. In de 18de eeuw, na de opbloei van de entomologie, begon de experimentele bestudering van plagen en hun bestrijding. Een aantal belangrijke etappes op de weg naar de tegenwoordige bestrijdingsmethodieken worden tot slot van het artikel vermeld.